

**Aus der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie des Fachbereichs Medizin der
Philipps-Universität Marburg**

in Zusammenarbeit mit dem Universitätsklinikum Gießen
und Marburg GmbH, Standort Marburg

Direktor: Univ. Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Andreas Neff

Der verstärkende Effekt einer Laserphotochemotherapie
mit Cisplatin oder Zolendronsäure bei Knochen- und
Knochentumorzellen in-vitro.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Zahnmedizin
dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität
Marburg

vorgelegt von
Akram Hayssam Saydali
aus Daraa, Syrien

Marburg, 2017

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-
Universität Marburg am:
27.10.2017

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. Helmut Schäfer
Referent: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Florian G. Draenert
Korreferent: Prof. Dr. med. dent. Andreas Braun

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. EINFÜHRUNG.....	9
1.1. PHYSIKALISCHE GRUNDLAGEN VON STRAHLUNG.....	9
1.1.1. Lichtstrahlung.....	9
1.1.2. Laserstrahlung.....	9
1.1.2.1. Wirkung der Laserstrahlung auf den Metabolismus der Zellen.....	10
1.1.2.2. Klinische Anwendung von Laserstrahlung in der Medizin....	12
1.2. PHOTODYNAMISCHE THERAPIE (PDT).....	14
1.2.1. Wirkungsweise der PDT.....	14
1.2.1.1. Photosensibilisatoren.....	15
1.2.1.2. Bestrahlung.....	16
1.2.2. Indikationsbereich der PDT in der Medizin und Zahnmedizin	17
1.3. ZYTOSTATIKA.....	19
1.3.1. Cisplatin.....	19
1.3.1.1. Wirkprinzip.....	19
1.3.1.2. Klinische Anwendungen.....	21

1.3.1.3. Mechanismen der Resistenzentwicklung.....	22
1.3.1.4. Nebenwirkungen.....	24
1.3.2. Zolendronsäure.....	24
1.3.2.1. Wirkprinzip.....	24
1.3.2.2. Klinische Anwendungen.....	27
1.3.2.3. Nebenwirkungen.....	27
1.4. LASERPHOTOCHEMOTHERAPIE.....	29
1.4.1. Prinzip der Laserphotochemotherapie.....	29
1.4.2. Biologische Grundlagen der Laserphotochemotherapie.....	29
1.4.3. Mögliche klinische Anwendungen der Laserphotochemo- therapie.....	31
1.5. DAS OSTEOSARKOM.....	33
1.5.1. Lokalisation.....	33
1.5.2. Epidemiologie.....	33
1.5.3. Klinik.....	34
1.5.4. Diagnostik.....	35
1.5.5. Metastasierung.....	35

1.5.6. Therapie.....	36
1.5.7. Prognose.....	36
1.6. ZIEL DIESER ARBEIT.....	37
2. MATERIAL UND METHODEN.....	39
2.1. ZELLINIEN.....	39
2.2. ZELLKULTUR.....	39
2.2.1. Auftauen der Zellen.....	40
2.2.2. Kultivieren der Zellen.....	40
2.2.3. Zellzahlbestimmung mit der Neubauer Zählkammer.....	41
2.2.4. Versuchsdurchführung.....	42
2.2.5. Einfrieren der Zellen.....	43
2.3. XTT-ASSAY.....	44
2.3.1. Material.....	44
2.3.2. Prinzip und Durchführung.....	44
2.4. HÄMATOXYLIN-EOSIN-FÄRBUNG.....	45
2.5. STATISTISCHE ANALYSE.....	46

3. ERGEBNISSE.....	48
3.1. XTT-MESSUNG.....	48
3.1.1. Alleinige Lasertherapie.....	48
3.1.2. Alleinige Chemotherapie.....	48
3.1.3. Photoaktivierte Chemotherapie.....	49
3.2. HISTOLOGIE.....	55
3.2.1. Alleinige Lasertherapie.....	55
3.2.2. Alleinige Chemotherapie.....	55
3.2.3. Photoaktivierte Chemotherapie.....	56
4. DISKUSSION.....	61
4.1. WIRKUNG VON CISPLATIN ODER ZOLENDRONsäURE AUF DIE ZELLBIOVIABILITÄT.....	61
4.2. EINFLUSS EINER LASERSTRAHLUNG AUF DIE ZYTOTOXIZITÄT VON CISPLATIN ODER ZOLENDRONsäURE.....	62
4.3. BIOLOGISCHE ERKLÄRUNG FÜR DIE WIRKUNG VON LASERPHOTOCHEMOTHERAPIE.....	64
4.4. MÖGLICHE KLINISCHE ANWENDUNG DER LASERPHOTOCHEMOTHERAPIE BEI KNOCHENTUMOREN.....	64

4.5. SCHLUSSFOLGERUNG.....	65
5. ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY.....	67
5.1. ZUSAMMENFASSUNG.....	67
5.2. SUMMARY.....	69
6. LITERATURVERZEICHNIS (IN ALPHABETISCHER ORDNUNG).....	71
7. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	101
8. LEBENSLAUF.....	103
9. VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER.....	103
10. DANKSAGUNG.....	104
11. EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG.....	105

1. Einführung

1.1. Physikalische Grundlagen von Strahlung

1.1.1 Lichtstrahlung

Licht ist eine elektromagnetische Strahlung. Abhängig von der Frequenz spricht man von Gammastrahlung, sichtbarem Licht, Röntgenstrahlung, Fernseh-, Mikro- und Radiowellen. Sie unterscheiden sich dabei in der Wellenlänge und Frequenz. Es gilt das folgende Prinzip: Je größer die Wellenlänge ist, desto kleiner ist die Frequenz. Die Frequenz ist eine Maß für die Anzahl der Schwingungen pro Zeiteinheit und wird mit der Einheit Hertz ($\text{Hz} = 1/\text{s}$) bestimmt. Als die Wellenlänge wird die Distanz zwischen zwei Punkten einer Welle mit gleicher Phase bezeichnet, bei denen der gleiche Schwingungsstatus besteht. Ihre Einheit ist Nanometer (nm). Zwischen der Ausbreitungsgeschwindigkeit (v), der Frequenz (f) und der Wellenlänge (λ) liegt folgende Beziehung vor: $v = \lambda \text{ mal } f$.

1.1.2. Laserstrahlung

Laser ist die Abkürzung für "Light Amplification by Stimulated

Emission of Radiation". Die Laserstrahlung unterscheidet sich vom gewöhnlichen Licht durch die folgenden Eigenschaften: sie ist einfarbig (monochromatisch) bzw. hat eine einzige Wellenlänge, welche die Farbe des ausgehenden Lichts und dessen Energie bestimmt. Diese emittierte Strahlung ist einheitlich (kohärent), das heißt, dass alle Photonen in der gleichen Phase sind, was eine große Lichtintensität bedeutet. Die Laserstrahlung hat eine bestimmte Richtung. Diese wird durch ein Bündel von Photonen determiniert. Die Wellen breiten sich parallel aus. Verantwortlich für diese Eigenschaften der Laserstrahlung ist die stimulierte Emission.

1.1.2.1. Wirkung der Laserstrahlung auf den

Metabolismus der Zellen

Für die Wirkung der Laserstrahlung auf Organismen stellen Mitochondrien einen der wichtigsten zellulären Rezeptoren dar. Hauptverantwortlich hierfür ist vor allem das Enzym Cytochrom-C-Oxidase. Es ist als Photorezeptor bekannt, wobei es sowohl als Schnittstelle zwischen dem oxidativem Energiestoffwechsel und den Signalwegen des Zellüberlebens als auch als ein terminales Enzym der mitochondrialen Atmungskette gesehen werden kann (Rojas et al., 2013).

Zudem hat Laserstrahlung auch eine stimulierende Wirkung auf die mitochondriale Membran, was sich unter anderem in der Veränderung von Transmembranpotentialen zeigt (Belletti et al., 2015). Die direkte Stimulierung der Mitochondrien durch Licht wird auch als Photobiomodulation bezeichnet (Vladimirov et al., 2004). Durch die Laserstrahlung kommt es zu einer Zunahme der Produktion von ATP (Adenosin-Triphosphat), RNA (Ribonukleinsäure), ROS (Reactive Oxygen Species) und spezifischen Transkriptionsfaktoren wie (AP-1) Activator Protein 1 und NF-kP (siehe Abbildung 1) (Javad et al. 2010). Ebenfalls zeigt sich eine Zunahme der zellulären Proliferation, der Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Expression von Osteopontin (Stein et al., 2005; Ueda et al. 2003).

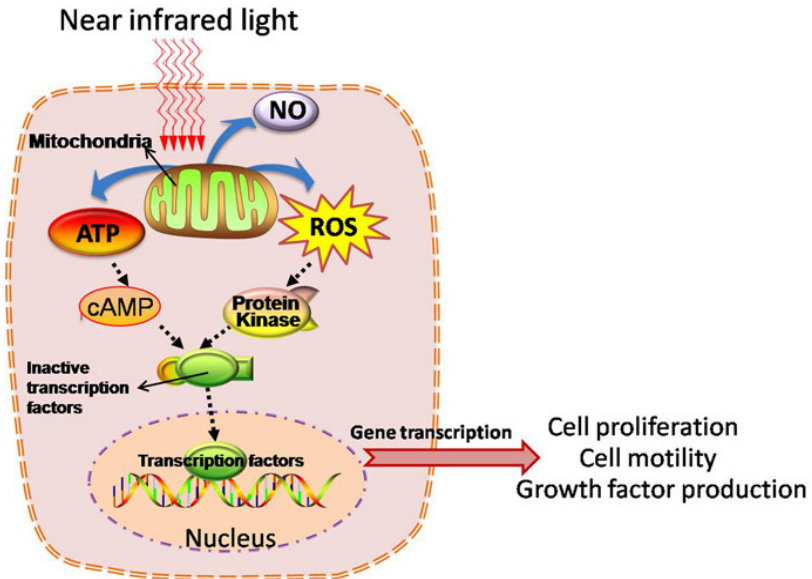


Abbildung 1: Wirkungsweise der Laserstrahlung auf der zellulären Ebene (modifiziert nach Huang 2009)

1.1.2.2. Klinische Anwendung von Laserstrahlung in der Medizin

Heutzutage werden Laser in der Medizin in vielen unterschiedlichen Bereichen verwendet. In der Dermatologie beispielsweise wird diese Technologie zur Depigmentierung, Hauterneuerung, Verdampfung und Behandlung von

vaskulären Läsionen eingesetzt (Mazer et al., 2002). Hochleistungslaser wie Nd:YAG-Laser (Neodym-dotierter Yttrium-Aluminium-Granat-Laser) oder Co2-Laser werden zur Exzision oder Vaporisation eingesetzt (Landthaler et al., 1995). Im Sinne von konservativen Maßnahmen wird dagegen eine energiearme Low-Level-Laser-Therapie in vielen medizinischen Bereichen supportiv verwendet. Im Unterschied zu den operativen Lasern arbeitet der Low-Level-Laser nur mit geringen Energien (Ide et al., 2014). Daher wird die Low-Level-Laser-Therapie, abgekürzt als LLLT auch als Soft Laser Therapie bezeichnet. Üblicherweise beschränkt sich die LLLT auf die Unterstützung der Wundheilung. Klinisch wird eine Abnahme der Entzündungen und eine Schmerzreduktion beobachtet (Farivar et al., 2014). So sind beispielsweise positive Behandlungsverläufe bei chronischen Knieschmerzen durch LLLT in der Literatur beschrieben worden (Nakamura et al., 2014). Ebenfalls konnte eine positive Beeinflussung der Hautalterung und der Heilung von chronischen Brandnarben beobachtet werden. Gleichzeitig wird das Nebenwirkungsprofil als gering bis nicht vorhanden beschrieben (Hersant et al., 2015). Nach Schädel-Hirn-Trauma konnte eine transkranielle Laserstrahlung auch Gedächtnis und Lernfähigkeit der Patienten verbessern. Hauptverantwortlich hierfür soll eine

Stimulierung der Neurogenese und eine Reduzierung des Zelltodes sein (Xuan et al., 2014).

1.2. Photodynamische Therapie (PDT)

1.2.1. Wirkungsweise der PDT

Prinzipiell stützt sich die photodynamische Therapie (PDT) auf die Stimulierung einer Klasse von speziellen Molekülen, sogenannten Photosensibilisatoren, durch Licht einer speziellen Wellenlänge, was zur Bildung von aktiven Formen von Sauerstoff (Sauerstoffradikalen) führt (siehe Abbildung 2) (Juzeniene et al., 2007; Sibata et al., 2001). Die so gebildeten Radikale weisen als Eigenschaft eine sehr kurze Lebensdauer (etwa 10 bis 320 Nanosekunden) und eine begrenzte Ausbreitung von 10 bis 55 nm auf (Moreira et al., 2012). Die entstandenen Sauerstoffradikale haben eine Eindringtiefe von 0,01-0,02 Mikrometer und eine geschätzte mittlere Lebensdauer 0,01-0,04 Sekunden (Moan et al., 1991). Mit Hilfe der PDT kann eine selektive Tumorerstörung mit geringer Beschädigung des umgebenden gesunden Gewebes erreicht werden (Gomer et al. 2006).

1.2.1.1. Photosensibilisatoren

Die PDT basiert auf einer Verwendung von lichtempfindlichen Molekülen, die als Photosensibilisatoren bezeichnet werden (Levy et al., 1994). Die Auswahl von Photosensibilisatoren ist von entscheidender Bedeutung für eine effiziente photodynamische Wirkung (Moreira et al., 2012). Klinisch und experimentell sind die folgenden Photosensibilisatoren untersucht worden: Photofrin (I und II), Benzoporphyrin-Derivat, Chlorine, Purpurine, Phthalozyanine, kationische Farbstoffe und Porphine sowie ALA-induzierte endogene Porphyrine (Wolf et al., 1999). Die verwendeten Photosensibilisatoren sind stark hydrophob, wasserunlöslich und neigen zu Aggregation, was zur Reduzierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und PDT-Aktivität führt (Avci et al., 2014). Die klinisch häufig verwendeten Substanzen zeichnen sich durch eine hohe Hydrophilie, gute Stimulation durch eine gängige Wellenlänge, geringe Toxizität vor Lichtaktivierung und vorzugsweise hohe Konzentration im Tumorgewebe sowie einen niedrigen Preis aus (Allison et al., 2013).

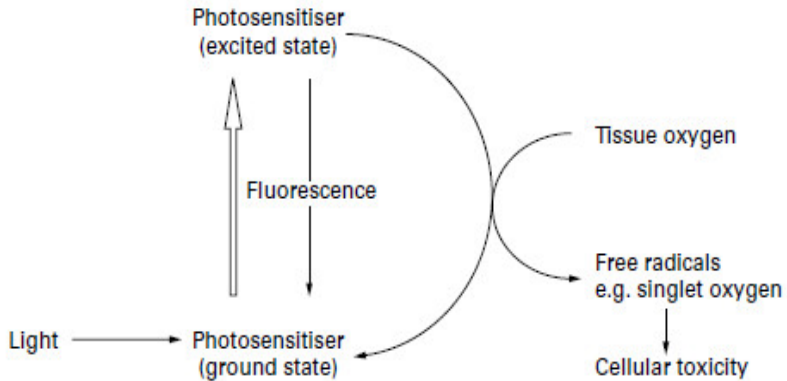


Abbildung 2: Darstellung der photodynamischen Therapie (modifiziert nach Mansfield 2001)

1.2.1.2. Bestrahlung

Um einen Photosensibilisator zu stimulieren, ist eine Bestrahlung von einer bestimmten Wellenlänge, die abhängig vom Absorptionsspektrum des Photosensibilisators zu wählen ist, nötig (Rkein et al., 2014; Basset-Seguin et al., 2013). Je tiefer die Gewebeschicht ist, die erreicht werden soll, umso höher ist die Wellenlänge zu verwenden. Während eine Wellenlänge von 400 nm eine Eindringtiefe von einem Millimeter hat (Brancaleon et al., 2002), verfügt eine Wellenlänge von 630 nm über eine Eindringtiefe von einem

halben Zentimeter (Sibata et al, 2001). Die richtige Wahl der Eindringtiefe ist auch notwendig, um den gewünschten therapeutischen Effekt zu erzielen und um die unerwünschten Nebenwirkungen der PDT möglichst gering zu halten (Mustafa et al., 2012). Darüber hinaus spielen Tumorgöße und anliegende anatomische Strukturen bei der Auswahl der richtigen Wellenlänge eine große Rolle. Die maximale Eindringtiefe des verwendeten Lichts begrenzt das Einsatzgebiet der PDT auf oberflächliche oder zumindest chirurgisch erreichbare Tumore.

1.2.2. Indikationsbereich der PDT in der Medizin und Zahnmedizin

Der Hauptvorteil der klinischen Anwendung der PDT ist die Fähigkeit, eine örtliche Behandlung auszuführen, welche systemische Nebenwirkungen nahezu verhindert. Darüber hinaus ermöglicht diese die Behandlung von Tumoren an empfindlichen Stellen (beispielsweise in direkter Nähe zu Nerven oder Blutgefäßen) (Meier et al., 2014). In unterschiedlichen medizinischen Bereichen kommen Dioden- und Excimer- sowie Halogenlasergeräte zum Einsatz. In der Dermatologie findet die PDT klinische Anwendungen zur

Behandlung oberflächlicher Hautkarzinome und aktinischer Keratosen (Wolf et al., 1999). Andere Einsatzmöglichkeiten sind Sklerodermie (Issa et al., 2010), Morbus Bowen (Kostovic et al., 2012) und multiple oberflächliche Karzinome, wobei die PDT, zusätzlich zur chirurgischen Behandlung, einer optimalen Heilung dient (Basset-Seguin et al., 2013).

Durch Einlagerung vom lokal verabreichten Photosensibilisator Phenothiazin-Chlorid in die Zellmembran der Bakterien führt eine Bestrahlung zu einer toxischen Wirkung auf Bakterien (Schneider et al., 2012). Daher findet die PDT als antimikrobielle Photodynamische Therapie, abgekürzt als aPDT, in der aktuellen Zahnmedizin eine klinische Anwendung. Indikationen hierfür sind die Behandlung der Parodontitis, Karies und Pulpitis (Gursoy et al., 2013) sowie der Periimplantitis (Bassetti et al., 2014). Unter Verwendung von Methylenblau, Toluidinblau oder einer der Porphyrin-Derivate als Photosensibilisator stellt sich die PDT auch als eine effektive klinische antimykotische Behandlungsstrategie dar (Javed et al., 2014). Weiterhin wird die Wirksamkeit der PDT bei der Behandlung von Burning Mouth Syndrom (BMS) und oraler Mukositis sowie rezidivierender Herpes-simplex-Infektion bestätigt (Pandeshwar et al., 2015).

1.3. Zytostatika

1.3.1. Cisplatin

1.3.1.1. Wirkprinzip

Cisplatin (cis-Diammindichloridoplatin) ist ein Zytostatikum, dessen chemische Formel $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Cl})_2]$ lautet. Cisplatin stellt einen planaren Cis-Komplex dar, der deutlich zytotoxischer als der Trans-Komplex ist und chemisch gesehen am zentralen Platinatom zwei cis-ständige Chloridliganden bindet (siehe Abbildung 3) (Zamble et al., 1995). Prinzipiell handelt es sich bei Cisplatin um eine so genannte Prodrug, die biologisch erst aktiviert werden muss. Nach zellulärer Aufnahme von Cisplatin findet eine Hydrolyse statt, was dann zu einer anschließenden Interaktion mit zellulären Nukleophilen wie beispielsweise der DNA führt (Andrews et al., 1990).

Vor allem basiert der molekulare Wirkungsmechanismus von Cisplatin auf einer unmittelbaren Bindung an die DNA (deoxyribonucleic acid) im Nukleus, wobei sich bevorzugt Vernetzungen an den Guanin-reichen DNA-Sequenzen bilden (Neidle et al., 2001). Dies führt zu DNA Vernetzungen innerhalb eines DNA-Strangs oder zwischen zwei DNA-Strängen (Casares et al., 2012). Dass die Zytotoxizität von

Cisplatin vor allem auf den Intrastrang-Vernetzungen basiert, wurde von Takahara postuliert (Takahara et al., 2002). Diese DNA-Vernetzungen von Cisplatin führen zu Strukturverzerrungen in der DNA, zur Hemmung der DNA-Replikation und -Transkription und schließlich zur Induktion des programmierten Zelltods, der Apoptose (Trimmer et al., 1999).

Auf unterschiedliche zelluläre Signalumwandlungskaskaden wirken sich die auftretenden DNA-Schädigungen aus. Als ein sehr wichtiger Aktivator von Apoptose gilt dabei das Tumorsuppressor-Protein (p53). Obwohl p53-defiziente Tumorzellen weniger auf Chemotherapie reagieren, ist ihre Resistenz nicht vollständig, was bedeutet, dass andere Apoptosewege vorhanden sind (Gong et al., 1999). Darunter stehen c-ABL (v-abl Abelson murine leukaemia viral oncogene homologue 1) und p73, welche auch zur Apoptose führen (Al-Bahlani et al., 2011; Yuan et al., 1999). Dazu gehören auch ERK (extracellular signal-regulated kinase), AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homologue) und MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Wang et al., 2005).

Der Cisplatin-induzierte Zelltod wird nicht immer als eine klassische Apoptose betrachtet. Je nach der Cisplatinkonzentration und dem zellulären Status kann

Cisplatin den Zelltod entweder durch ein apoptotisches Programm (Apoptose) oder durch Nekrose induzieren (Gonzalez et al., 2001). Erhöht sich die Cisplatinkonzentration über 50 μ molar, erniedrigt sich die Caspase-3-Aktivität. Dies deutet darauf hin, dass die Nekrose, anstelle der Apoptose, für den Zelltod bei höheren Konzentrationen von Cisplatin verantwortlich ist (Alan et al., 1999). Es wurde berichtet, dass mindestens 50% der Cisplatin-induzierten Apoptose durch p53 vermittelt wird, wobei p53 Caspase 3 aktiviert, unabhängig von Caspase 9, 8 oder mitochondrialer Dysfunktion. Darüber hinaus ist 50% der Cisplatin-induzierten Apoptose unabhängig von p53 und Caspasen 3, 8 und 9 (Cummings et al., 2002).

1.3.1.2. Klinische Anwendungen

Die erste Anwendung von Cisplatin wurde von Rosenberg beschrieben. Er beobachtete einen toxischen Einfluss des Zytostatikums auf *Escherichia coli* Bakterien. Des Weiteren wurde es in einem Tiermodell zur Behandlung von Hodenkrebs erfolgreich getestet (Rosenberg et al., 1969; Rosenberg et al., 1965). In der heutigen Onkologie findet Cisplatin alleine oder kombiniert mit anderen Zytostatika als First-Line-Therapie oder als multimodales Therapiekonzept Verwendung (Basu et al.,

2010). Heutzutage wird Cisplatin häufig in der Chemotherapie von Gallenblasen- (Eckel et al., 2007), Hoden- (Go et al., 1999) und Kopf-Hals-Tumoren (Visacri et al., 2015) eingesetzt. So werden beispielsweise bei metastasierenden Hodentumoren Heilungsraten bis zu 80% beschrieben (Jones et al., 2003).

1.3.1.3. Mechanismen der Resistenzentwicklung

Im Laufe einer Behandlung mit Cisplatin kann ein Wirkungsverlust des Zytostatikums bei der zu behandelnden Tumorentität beobachtet werden. Die Cisplatinresistenz von Tumorzellen wird beispielsweise durch Inhibierung der Apoptoseinduktion und verminderter Cisplatinbindung an die DNA erklärt.

Die Reduktion der Apoptoseinduktion im Tumorgewebe wird auf eine verringerte intrazelluläre Konzentration von Cisplatin zurückgeführt. Dies wird durch eine verringerte intrazelluläre Aufnahme erreicht, indem verstärkt Kollagen in die Zellmembran von Tumorzellen eingelagert wird (Sherman-Baust et al., 2003). Zudem erhöht sich die Resistenz gegen Cisplatin durch erhöhte intrazelluläre Level an Antioxidantien wie Glutathion (Wang et al., 2004). Es wurde zudem gezeigt,

dass eine sehr hohe Cisplatinresistenz stets in Zusammenhang mit einer verstärkten Expression von mRNAs für Gamma-Glutamyl-Cystein-Synthetase und Gamma-Glutamyl-Transpeptidase steht (Godwin et al., 1992). Als ein weiterer möglicher Resistenzmechanismus wird eine erhöhte Reparatur von DNA-Vernetzungen angeführt (Siddik et al., 2003). Normalerweise führt Cisplatin-DNA-Vernetzung zur Inhibition von Replikation, Transkription, Translation und DNA-Reparatur. Dabei sind unterschiedliche Methoden der DNA-Reparatur bekannt (O-6-Alkyltransferaseaktivität, Basenexzisions-, Mismatch- und genspezifische Reparatur). Dabei ist die Nucleotide Exzision-Reparatur als einer der wichtigsten Mechanismen zur Reparatur von Cisplatin-DNA-Vernetzungen hervorzuheben (Reed et al., 1998). Als ein Marker-Gen wurde die Nucleotide-Excision-Reparatur-Quer-Komplementationsgruppe 1 (ERCC1) identifiziert (Li et al., 2013). Das Mismatch-Reparatursystem ist im Stand, fehlende Basenpaarungen von Nucleotiden zu erkennen und zu reparieren. Erfolgt ein Funktionsverlust in diesem System, erhöht sich die Wirkung von Cisplatin deutlich (O'Brien et al., 2006).

1.3.1.4. Nebenwirkungen

Die Nebenwirkungen von Cisplatin reichen von Übelkeit und Erbrechen über verminderte Reaktion auf eine Infektion (Immunsuppression) bis hin zu einer verringerten Produktion der Blutzellen (Knochenmarkhemmung) (Florea et al., 2011). Außerdem werden Hörverlust, Neurotoxizität und Nierentoxizität beobachtet. Durch eine suffiziente Hydratation und Vermeidung von nephrotoxischen Medikamenten lässt sich ein Nierenschutz erreichen. Als einer der prinzipiell dosisbeschränkenden Faktoren wird die Neurotoxizität gesehen (Tsang et al., 2009).

1.3.2. Zolendronsäure

1.3.2.1. Wirkprinzip

Dadurch, dass Bisphosphonate, die chemisch dem Pyrophosphat ähnlich sind, anstelle von einer P-O-P-Bindung eine P-C-P Bindung haben, sind sie gegenüber Hydrolyse resistent (Knut et al., 2005). Bisphosphonate unterteilen sich in stickstoffhaltige Bisphosphonate (Alendronate, Ibandronate, Pamidronate, Risedronate und Zoledronate) und stickstofffreie Bisphosphonate (Clodronate, Etidronate, und Tiludronate), die

sich in ihrer molekularen Wirkungsweise unterscheiden (Coxon et al., 2000). Stickstoffhaltige Bisphosphonate hemmen das Schlüsselenzym des Mevalonsäurezykluses, indem sie beispielsweise die Protein-Prenylierung von Osteoklasten hemmen. Im Gegensatz dazu wandeln sich stickstofffreie Bisphosphonate zu toxischen nichthydrolysierbaren Adenosintriphosphatanaloga (ATP-Analoga) (Frith et al., 2003).

Dadurch, dass die oben beschriebenen zellulären Einflüsse das Zellskelett von Osteoklasten zerstören und ihre Apoptose verursachen, erfolgt eine Hemmung der Knochenresorption (Benford et al., 2001). Gleiche Ergebnisse sind in-vitro ebenfalls für orale Epithelzellen, Fibroblasten und Keratinozyten (Ravosa et al., 2011; Moharamzadeh et al., 2007) sowie für Osteoblasten (Patntirapong et al., 2012) beobachtet worden. Bisphosphonate führen zu einer Verringerung des Knochenumbaus und Erhöhung der Knochenfestigkeit, -Masse und -Mineralisierung, indem sie sich vorwiegend an Resorptionsseiten binden, welche standardmäßig von Osteoklasten belegt sind (Rodan et al., 2002). Intravenös verabreichte Bisphosphonate werden teilweise im Knochen eingelagert, wobei deren Halbwertszeit von 1 bis zu 10 Jahren reicht. Sie ist zudem abhängig von der

Quote des Knochenumbaus und -Verteilung. Ihre Exkretion findet größtenteils renal statt, wobei beinahe kein Metabolismus erfolgt (Lin et al., 1996). Bei oraler Gabe sind dagegen die Resorptionsraten von Bisphosphonaten relativ gering (1-2%) (Katsumi et al., 2010). So wurde gezeigt, dass bei 91% der Patienten, denen Bisphosphonate verschrieben wurden, eine gleichzeitige orale Kalziumsubstitution die enterale Resorption der Bisphosphonate deutlich herabsetzte (Nye et al., 2013).

Neben den beschriebenen Wirkungen auf den Knochenmetabolismus haben Bisphosphonate auch einen Einfluss auf Tumorzellen. Durch eine verstärkte Apoptose der Endothelzellen und Verringerung derer Bioviabilität sowie der Kapillarformung ließ sich in-vitro und in-vivo eine Inhibierung der Neoangiogenese beobachten (Misso et al., 2012; Caraglia et al., 2006). Eine antiproliferative Auswirkung für unterschiedliche Tumorentitäten ist Gegenstand zahlreicher Publikationen. In-vitro wurde eine direkte zytotoxische Wirkung der Bisphosphonate auf Brustkrebszellen gezeigt (Jagdev et al., 2001). Sowohl bei dem Multiplen Myelom als auch beim Prostatakarzinom wurde eine Hemmung der tumorinduzierten Knochenresorption in-vitro beobachtet (Algur et al., 2005). Des Weiteren finden Bisphosphonate auch eine Anwendung in der

Behandlung der tumorinduzierten Hyperkalzämie (McKeage et al., 2008).

1.3.2.2. Klinische Anwendungen

Pharmakologisch wird Zolendronsäure zu den Bisphosphonaten gezählt. Zu den klinischen Anwendungsgebieten zählen die Osteoporose (Molvik et al., 2015), die malignomassoziierte Hyperkalzämie (Tai et al., 2014), das Mamma- und Prostatakarzinom und Myelom (Reid et al., 2009) sowie Morbus Paget (Wendlová et al., 1999).

1.3.2.3. Nebenwirkungen

Bei einer Gabe von über 800 mg/Tag wird die normale Skelettmineralisierung beeinträchtigt, was das Frakturrisiko erhöht (Adami et al., 1996). Außerdem besteht das Risiko einer Hypokalzämie (Kreutle et al., 2014). Zudem werden bei oraler Einnahme Diarrhö, Ösophagitis, Gastritis und Verdauungsstörung beschrieben. Nach der ersten intravenösen Applikation kann es zu Leukozytose und Fieber kommen (Anastasilakis et al., 2012). Bei der Behandlung der Osteoporose kann die Bisphosphonat-assoziierte

Kiefernekrose auftreten, die in der englischsprachigen Literatur als bisphosphonate related osteonecrosis of the jaw (BONJ) bezeichnet wird. Alter über 60 Jahre, weibliches Geschlecht und frühere invasive Zahnbehandlung sind die häufigsten Risikofaktoren (Pazianas et al., 2007). Gemäß der American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons wird die Bisphosphonat-assoziierte Kiefernekrose folgendermaßen definiert: freiliegende Knochen in der Mundhöhlenbereich mit über acht Wochen persistierenden Knochenläsionen und ohne vorherige Radiotherapie (Reid et al., 2009). Hohe kumulative Dosen von Bisphosphonaten, schlechte Mundhygiene und Zahnextraktionen stellen weitere Risikofaktoren dar (Hoff et al., 2008). Als Symptome werden freiliegende Knochen, Schmerzen, Schwellungen und eitrige Sekrete beschrieben. Teilweise kommt es dabei zur Bildung von extraoralen Fistelgängen (Kang et al., 2011). Röntgenologisch zeigen sich persistierende Extraktionsalveolen, Sequesterbildung, Sklerosierungen und Osteolysen (Mawardi et al., 2009). Therapeutisch wird ein chirurgisches Debridement unter antibiotischer Abschirmung durchgeführt (Tirelli et al., 2009).

1.4. Laserphotochemotherapie

1.4.1. Prinzip der Laserphotochemotherapie

Die Laserphotochemotherapie entwickelte sich aus der Photodynamischen Therapie (PDT). Hierbei erfolgt eine Toxizitätssteigerung von Chemotherapeutika durch Lichtaktivierung (besonders Metallkomplexe wie Platinverbindungen) (Shaili et al., 2014).

1.4.2. Biologische Grundlagen der Laserphotochemotherapie

Die Laserphotochemotherapie besteht aus einer Kombination von lokal applizierter Laserstrahlung über interstitielle Faseroptik und einem Chemotherapeutikum. Dadurch, dass eine maximale tolerierte Dose vom Chemotherapeutikum photochemisch und thermisch durch die Laserstrahlung aktiviert wird, verbessert sich die gezielte Therapie und reduziert sich die systematische Zytotoxizität, die bei einer intravenösen Applikation von dem entsprechenden Chemotherapeutikum erfolgt (Paiva et al., 2011).

Es wird Cisplatin (cis-Diamindichloroplatin) als Standardchemotherapeutikum bei vielen epithelialen Tumoren

beschrieben (Zhang et al., 2003). Obwohl das Transplatin nicht zytotoxisch ist, führt die UV-A Lichtbestrahlung zur ähnlichen Zytotoxizität wie Cisplatin (siehe Abbildung 4) (Heringova et al., 2006). Beispielsweise wirken alle Analoga von Cisplatin die Keratinozyten nicht toxisch. Erfolgt eine Laserstrahlung, entsteht ein toxischer Effekt darauf (Bednarski et al., 2007). Bei anderer Studie war die DNA-Beschädigung mit Platin-Komplexen III und IV, ohne die PDT zu applizieren, wenig oder nicht beobachtbar (Westendorf et al., 2011). Ähnliche Toxizitätssteigerung auch bei Carboplatin beobachtet (Mlcouskova et al., 2012). Es wurde eine Weiterentwicklung photosensibler Liganden zur Toxizitätssteigerung berichtet, wobei sich das sogenannte H-Bonding und hydrophobe Wechselwirkungen zusätzlich zur Bindung an DNA einfinden (Pizarro et al., 2009).

Es wurde gezeigt, dass Anthracyclin ein möglicher Kandidat für Licht oder Wärmeaktivierung in Krebszellen ist. Dadurch findet Anthracyclin sowohl als Chemotherapeutikum als auch als Photosensibilisatoren eine medizinische Anwendung bei der Laserphotochemotherapie (Saxton et al., 1995).

1.4.3. Mögliche klinische Anwendungen der Laserphotochemotherapie

Als mögliche klinische Indikationen wären die fibröse Dysplasie; Morbus Paget (Ostitis deformans) und das Osteosarkom.

Für die fibröse Dysplasie gibt es momentan keinen einheitlichen Therapiestandard (Menon et al., 2013). Eine intravenöse Zolendronsäure (unter zulassungs-überschreitender Anwendung, auch als off-label use bezeichnet) wird in der Literatur diskutiert (Mansoori et al., 2010). Im Vergleich zu anderen bisher verfügbaren Medikamenten wird beim Morbus Paget (Ostitis deformans) bei Zolendronsäure eine Langzeitremission beschrieben (Tucci et al., 2015; Maricic et al., 2007). Bei Therapie vom Osteosarkom ist Cisplatin ein Teil der Standardchemotherapie (Bielack et al., 2009; Rha et al., 1999).

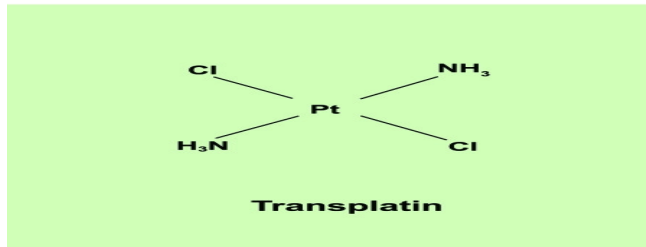
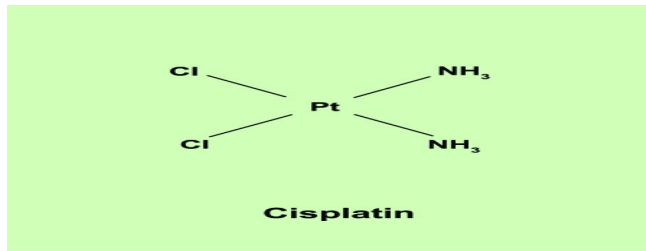


Abbildung 3: Strukturformeln von Cisplatin und Transplatin (modifiziert nach Galea 2008)

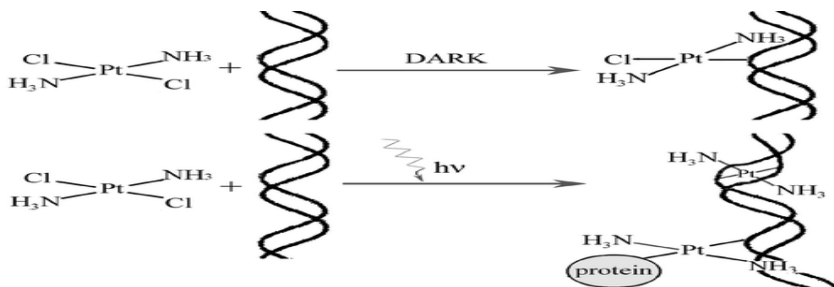


Abbildung 4: Darstellung der UV-A Lichtstrahlung induzierten Toxizität von Transplatin (modifiziert nach Heringova 2006)

1.5. Das Osteosarkom

Das Osteosarkom, repräsentiert durch die Saos-2-Zelllinie in dieser in-vitro-Studie, ist der häufigste primäre bösartige Tumor der Knochen (Haddox et al., 2014). 5–13% aller Osteosarkome betreffen den Kiefer (Gerressen et al., 2006).

1.5.1. Lokalisation

Das Osteosarkom tritt im Kopf- und Halsbereich selten und oft ohne klare Ursache auf (Arora et al., 2013; Sturgis et al., 2003). Es besteht kein offensichtlicher Unterschied in der Inzidenz des Auftretens zwischen Ober- und Unterkiefer (Takenoshita et al., 2007). Bevorzugte Prädilektionsstellen sind im Unterkiefer der Corpusbereich und im Oberkiefer alveolarkammnah mit Beteiligung der Kieferhöhle (Mardinger et al., 2001).

1.5.2. Epidemiologie

Es konnte gezeigt werden, dass Frauen häufiger als Männer betroffen sind (Argon et al., 2015), wobei bei jungen

Altersgruppen das Auftreten bei beiden Geschlechtern nahezu gleich verteilt ist (Chidzonga et al., 2009).

1.5.3. Klinik

Das OSJ ist ein zum Lokalrezidiv neigender maligner mesenchymaler Tumor und stellt sich in der Regel mit einem aggressiven klinischen Verlauf dar (Samraj et al., 2014; Gerressen et al., 2006). Trotz des gleichen histologischen Aussehens unterscheidet sich das OSJ vom Osteosarkom der langen Knochen in seinem biologischen Verhalten (Gerressen et al., 2006; Mardinger et al., 2001), indem das OSJ relativ weniger aggressiv ist (Basu et al., 2009). Trotz der Variabilität der berichteten histologischen und radiologischen Merkmalen vom OSJ wurde in der Mehrzahl der Fälle eine schmerzhaftes Schwellung des Kiefers als die erste klinische Manifestation beschrieben (Amini et al., 2013). Modarressi berichtete, dass Patienten mit OSJ in etwa 20 % der Fälle an einer schmerzhaften oder schmerzlosen Schwellung litten, einhergehend mit einer Parästhesie des betroffenen Trigeminasastes (Modarressi et al., 2006).

1.5.4. Diagnostik

Eine frühzeitige Diagnose vom OSJ ist für den weiteren Therapieverlauf von immenser Bedeutung, da mit frühzeitiger Erkennung sich die Prognose deutlich verbessert (Angiero et al., 2011; Mardinger et al., 2001). Das OSJ zeichnet sich durch ein sehr heterogenes Bild in der Röntgendiagnostik aus (Arora et al., 2013). In der heutigen Literatur sind Fälle beschrieben, die klinisch verkalkten Lymphknoten ähneln (Hatano et al., 2005). Röntgenologisch zeigen sich lokalisierte Knochenzerstörung und abnorme Knochenbildung. Außerdem stellt sich die Kieferkortikalis deutlich aufgelockert dar, ähnlich wie Sonnenstrahlen (Soares et al., 2005). Das Aussehen kann osteolytisch, osteogen oder gemischt sein (Jitendra et al., 2012; Forteza et al., 1986). Durch die stetige Weiterentwicklungen der Bildgebung hat sich die präoperative Diagnostik deutlich verbessert (Bras et al., 2007).

1.5.5. Metastasierung

Die Metastasierung erfolgt frühzeitig hämatogen in die Lunge (Prietz et al., 2003). Das Osteosarkom der langen Knochen zeigt auch eine ausgeprägte Metastasierung in Knochen und Rippenfellern (Jia et al., 2014). Im Gegensatz dazu zeichnet

sich das Osteosarkom des Kiefers durch eine geringere Metastasierungsrate aus (Fang et al., 2016).

1.5.6. Therapie

Die Manifestation im Bereich der Mandibula oder Maxilla ist durch eine besondere anatomische Nähe zu Nerven und Gefäßen gekennzeichnet. Die radikal chirurgische Resektion ist die Therapie der Wahl (Adwani et al., 2014; Gerressen et al., 2006), was aber auf Grund der komplexen Anatomie zu Problemen bei der Wiederherstellung von Kieferform und -Funktion führen kann. Das Vorhandensein von Mikrometastasen bestimmt die Notwendigkeit einer adjuvanten Therapie. Die Strahlentherapie wird meist bei rezidivierenden und inoperablen Osteosarkomen angewendet (Chaudhary et al., 2012).

1.5.7. Prognose

Je früher die Behandlung initiiert wird, desto besser ist die Prognose (Nissanka et al., 2007). Nach kompletter chirurgischer Resektion wird in der Literatur Langzeitüberlebensdauer bis zu 83.2% nach 10 Jahren beschrieben, wobei neo- oder adjuvante Chemotherapie das

therapeutische Outcome nicht zusätzlich verbessern (Baumhoer et al., 2014). Die Prognose verbessert sich durch kombinierte Behandlung in Form einer radikalen Resektion, gefolgt von einer Strahlen- und / oder Chemotherapie (Guadagnolo et al., 2009).

1.6. Ziel dieser Arbeit

Die Wirkungsweise einer Low-Level-Lasertherapie in Kombination mit einem Zytostatikum als möglichem Photosensibilisator auf den zellulären Metabolismus ist relativ unklar. So konnte klinisch und experimentell gezeigt werden, dass eine alleinige Laserstrahlung bei Chemotherapie induzierter oraler Mukositis adjuvant wirkt. Es wurde unter Anwendung von Low-Level-Lasertherapie eine wesentliche Reduktion von schwerer oraler Mukositis und der dadurch ausgelösten Schmerzen beobachtet (Spivakovsky et al., 2015; Antunes et al., 2013).

Im Gegensatz dazu konnten mehrere in-vitro Arbeiten zeigen, dass eine Low-Level-Laserstrahlung mit gleichzeitiger Inkubation mit Zolendronsäure oder Cisplatin zu deren Toxizitätssteigerung führen können (Heymann et al., 2014). Es wurde auch im Tiermodell gezeigt, dass die Toxizität von

Cisplatin bei Plattenepithelkarzinom durch photodynamische Therapie gesteigert werden kann (Uehara et al., 2006).

Ziel der vorliegenden Studie ist es daher, die Möglichkeit einer in-vitro Kombination von Low-Level-Laserstrahlung mit Cisplatin oder Zolendronsäure auf den Zellstoffwechsel von primären humanen Osteoblasten und Knochen-Tumorzellen (Saos-2 Zelllinie) zu untersuchen. Hieraus könnten sich neue Therapieoptionen, ähnlich einer Photodynamischen Therapie, in der lokalen Behandlung von Knochentumoren im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich entwickeln.

2. Material und Methoden

2.1. Zelllinien

In dieser Arbeit wurden entweder primäre humane Osteoblasten (HOB) oder Osteosarkomzellen (Saos-2 Zellen) verwendet. Primäre humane Osteoblasten wurden von der Firma Promocell (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland, Bestellnummer C-12720) erworben. Hierbei handelt es sich um Isolate aus menschlichem Femur, Hüfte und Knie.

2.2. Zellkultur

Zur Kontaminationsvermeidung wurden alle verwendeten Materialien vor ihrer Verwendung desinfiziert oder sterilisiert und die jeweiligen Arbeitsschritte in einer Sterilbank (Terralin, Schülke und Mayer, Norderstedt, Deutschland) durchgeführt. Die Inkubation beider Zelllinien fand bei 37 °C Temperatur und 5% CO₂ statt. Für primäre humane Osteoblasten wurde gemäß Herstellerangaben das Growth Medium (PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland, Bestellnummer C-39615) verwendet. Saos-2 Zellen wurden mit DMEM (Dulbecco's

Modifiziertes Eagle Medium, Gibco brand Invitrogen Inc., Carlsbad, USA) mit 5% fetalem Kälberserum (Pan Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland) kultiviert.

2.2.1. Auftauen der Zellen

Es wurden 10 ml des entsprechenden Mediums in eine Petrischale pipettiert. Aus dem flüssigen Stickstoff wurde das Cryo TubeTM Vial der Firma Nunc A/S (Roskilde, Dänemark) mit der entsprechenden Zelllinien entnommen und im 37 °C Wasserbad erwärmt. Ein erneuter Mediumwechsel wurde am darauffolgenden Tag durchgeführt, um das DMSO komplett zu entfernen.

2.2.2. Kultivieren der Zellen

In Petrischalen (100 x 20 mm, Sarstedt, Newton, USA) wurde die jeweilige Zelllinie kultiviert, bis eine Konfluenz von etwa 70-80% erreicht war. Nur die 3. – 4. Passage der primären Osteoblasten wurden verwendet. Um die Zellen zu passagieren, wurde das Medium entfernt und danach erfolgte eine Spülung des Zellrasens mit 37 °C warmem Phosphatpuffer (Phosphate buffered Saline (PBS) 10 mM, pH 7.4, GibcoLifetechnologies Ltd., Paisley, UK). Daran schloss

sich eine 15 minütige Inkubation der so vorbehandelten Zellen mit 25 °C warmer Trypsinlösung (Trypsin-EDTA, PAA Laboratories, Pasching Österreich) an. Die Trypsinisierung wurde durch das Hinzufügen von 3 ml Medium gestoppt. Nach dem Zentrifugieren (Megafuge 2.0R der Firma Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 2000 Umdrehungen pro Minute für 7 Minuten wurde der Überstand abgesaugt und mit dem jeweiligen Nährmedium resuspendiert.

2.2.3. Zellzahlbestimmung mit der Neubauer

Zählkammer

Die Neubauer Zählkammer besteht aus neun großen Quadraten mit jeweils einer Fläche von 1 mm² und einer Tiefe von 0,1 mm, woraus sich ein Volumen von jeweils 0,1 µl pro Quadrat ergibt. Für eine Zellzahlbestimmung wurde ein Volumen von 10 µl Zellsuspension verwendet. Es wurden bei 100facher Vergrößerung (Mikroskop Axiovert 25 der Firma Zeiss, Jena, Deutschland) vier von neun großen Quadraten ausgezählt. Für jede Versuchsreihe wurden 600.000 Zellen in 12 Milliliter des entsprechenden Nährmediums verwendet.

2.2.4. Versuchsdurchführung

Am ersten Tag wurde die entsprechende Zelllinie mit einer Zelldichte von 5000 Zellen pro Well auf die 96-well Platte (REF 83.3924, Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) übertragen. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurde am zweiten Versuchstag den Zellen entweder Cisplatin (CisDiamminedichloroplatinum(II), Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH, Seelze, Deutschland) nach voriger Lösung in PBS in den Konzentrationen von 3.25, 6.5, 13 und 26 μmolar oder Zolendronsäure (Zolendronsäure, Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland, 4mg/5ml) in den Konzentrationen von 50, 100 und 200 μmolar hinzugegeben. Als Vergleichgruppen dienten Wells ohne das entsprechende Zytostatikum. Am dritten und vierten Tag wurden die Zellen mit einem 670 nm Diodenlaser (Helbo Photodynamic Systems, Bredent Medical GmbH & Co KG, Walldorf, Österreich) bei einer Energiedosis von 100 mW/cm^2 jeweils 2 Minuten lang bestrahlt. Hierfür wurde gemäß Herstellerangaben die 2D Spot Probenaufsätze (Helbo Photodynamic Systems, Bredent Medical GmbH & Co KG, Walldorf, Österreich) verwendet. Nicht bestrahlte Wells dienten als Kontrollgruppe. Wells, welche nicht bestrahlt werden sollten, wurden mit einer Alufolie abgedeckt. Am vierten Versuchstag wurde drei Stunden nach

der letzten Bestrahlung entweder ein Zellbioviabilitätstest mittels XTT oder eine H.E.-Färbung für die nachfolgende histologische Untersuchung durchgeführt. Drei verschiedene Versuchsansätze wurden für das entsprechende Zytostatikum (Cisplatin oder Zolendronsäure) und die jeweilige Zelllinie (primäre humane Osteoblasten oder Saos-2 Zellen) sowie die entsprechende nachfolgende Untersuchung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung oder XTT-Messung) eingeplant.

2.2.5. Einfrieren der Zellen

Durch Trypsin wurden die Zellen vom Boden der Petrischale abgelöst und in ein Medium aufgenommen. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand entfernt, und die Zellen wurden in 1 ml DMEM resuspendiert und in ein Cryo TubeTM Vial transferiert. Bevor die Zellen eingefroren wurden, wurden ihnen 0,5 ml DMSO (Dimethylsulfoxid, Roth, Karlsruhe, Deutschland) hinzugefügt und untergemischt. Bei einem Temperaturgradienten von -20 °C bis -80 °C erfolgte ein schrittweiser Einfrierungsprozess.

2.3. XTT-Assay

2.3.1. Material

Für diesen Versuchsaufbau wurde das Cell Proliferation Kit II (XTT) der Firma Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Deutschland) verwendet.

2.3.2. Prinzip und Durchführung

Dieser Test wird für die Messung der metabolischen Aktivität von lebenden Zellen verwendet und beruht auf einer nicht-radioaktiven quantitativen Bestimmung der Zellbiовiabilität sowie der Zellproliferation. Das Schlüsselenzym ist die intramitochondriale Dehydrogenase, welche das gelbe Tetrazoliumsalz (2,3-Bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid-Salz) in den löslichen orangen Farbstoff Formazan umwandelt (siehe Abbildung 5). Dadurch, dass dieser entstehende Farbstoff eine wasserlösliche Eigenschaft hat, lässt er anhand eines ELISA-Readers quantitativ bestimmen, was indirekt, ausschließlich bei den lebenden Zellen, den Messungen deren Zahl und Vitalität dient.

Der Herstelleranweisung zufolge wurden 50 µl vom XTT-

Reagenz (zusammengesetzt aus Electron-coupling reagent und XTT labeling reagent und im Verhältnis 1 zu 50) in jedes Well der 96-well Platte pipettiert und danach für drei Stunden inkubiert. Daran schloss sich eine Messung in dem Microreader (DTX 880, multimode detector, Beckman Counter, Naumburg, Deutschland) mittels der zugehörigen Beckman Counter Multimode Analyse Software an. Die Wellenlänge zur Messung der Absorption betrug 492 nm. Die Hintergrundabsorption wurde mit einer Wellenlänge von 750 nm detektiert.

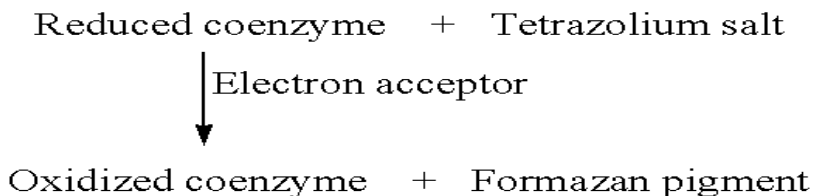


Abbildung 5: Die Umwandlung von Tetrazolium in Formazan (modifiziert nach Tazoe 2000)

2.4. Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Der Versuchsaufbau für die histomorphologische

Untersuchung entsprach der XTT-Messung. Zuerst wurden die Zellen mit PBS Puffer zwei Minuten gespült, mit Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert und mit 70-prozentigem Alkohol (Merck, Darmstadt, Deutschland) abgespült. Im Anschluss wurde eine klassische H.E.-Färbung (Mayers Hämalaunlösung und Eosin, beide Substanzen von Merck, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt und die Platte hintereinander mit steigenden Alkoholkonzentrationen (70% - 90% - 100%) entwässert. Die so gefärbten 96-well Platten wurden unter dem Mikroskop (Zeiss AxioVert 135 Mikroskope mit AxioCam MRc5, Oberkochen, Deutschland) bei 100 facher Vergrößerung beurteilt und Übersichtsaufnahmen angefertigt. Die histomorphologische Auswertung erfolgte mit der zugehörigen Software (AxioVision Software, Zeiss Inc., Oberkochen, Deutschland).

2.5. Statistische Analyse

Mit Hilfe von der Software IBM SPSS Statistics Version 22.0 (SPSS GmbH, München, Deutschland) wurde eine statistische Auswertung der Ergebnisse vorgenommen.

Hierfür wurde die Normalverteilung der Werte mit dem Shapiro-Wilk-Test beurteilt. Da die Daten nicht normal verteilt

waren, wurden die Werte zwischen den Gruppen mit einem nicht-parametrischen Test (Kruskal-Wallis) und Mann-Whitney U-Test analysiert. Die Unterschiede wurden als statistisch signifikant bei $p < 0,05$ betrachtet. Box-Plot-Diagramme zeigen den Median und das erste und dritte Quartil sowie die Minimal- und Maximalwerte.

3. Ergebnisse

3.1. XTT-Messung

3.1.1. Alleinige Lasertherapie

Bei beiden Zelllinien führte eine alleinige Laserstrahlung ohne Chemotherapie zu einer signifikanten Steigerung der Bioviabilität im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrollgruppe (für Osteoblasten $p = 0.0023$ und für Saos-2 Zellen $p = 0.0032$) (siehe Abbildung 6A, 6B, 7A und 7B).

3.1.2. Alleinige Chemotherapie

Im Vergleich zur Kontrollgruppe führten alle Konzentrationen von Zolendronsäure (50, 100 und 200 μmolar) zu einer signifikanten Reduzierung der Bioviabilität von Osteoblasten ($p = 0.026$, $p = 0.021$, $p = 0.031$) (siehe Abbildung 6A). Ähnliche Ergebnisse zeigten sich bei der Inkubation mit Cisplatin bei 13 und 26 μmolar ($p = 0.001$, $p = 0.001$). Die Inkubation mit geringeren Konzentrationen 3.25 ($p = 0,266$) und 6.5 μmolar ($p = 0.57$) von Cisplatin hatte aber keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die Zellbioviabilität (siehe Abbildung 7A).

Alle Konzentrationen von Zolendronsäure (50, 100 und 200 μ molar) (Alle $p < 0.001$) und Cisplatin (3.25, 6.5, 13 und 26 μ molar) (Alle $p < 0.001$) führten zu einer signifikanten Abnahme der Bioviabilität von Saos-2 Zellen (siehe Abbildung 6B und 7B).

3.1.3. Photoaktivierte Chemotherapie

Eine gleichzeitige Laserstrahlung erhöhte die Zytotoxizität von Zolendronsäure bei 100 und 200 μ molar bei Osteoblasten ($p = 0.029$, $p < 0.001$). Bei 50 μ molar führte sie zu einer statistisch nicht signifikanten Zunahme der Zytotoxizität ($p = 0.445$) (siehe Abbildung 6A). Vergleichbare Resultate zeigten sich bei einer Inkubation mit Cisplatin. Bei höheren Konzentrationen von Cisplatin (6.5, 13 und 26 μ molar) kam es zu einer signifikanten Steigerung der Toxizität durch Laserstrahlung ($p = 0.024$, $p = 0.027$, $p = 0.027$). Dies war jedoch bei der niedrigsten Cisplatinkonzentration (3.25 μ molar) statistisch nicht signifikant (Siehe Abbildung 7A).

Für Saos-2 Zelllinie war bei jeder verwendeten Konzentration von Cisplatin (3.25, 6.5, 13 und 26 μ molar) eine deutliche Toxizitätszunahme durch Laserstrahlung zu beobachten (siehe Abbildung 7B). Bei Zolendronsäure war diese Wirkung nur bei

den beiden höchsten Konzentrationen (100 und 200 μ molar) zu beobachten ($p < 0.001$, $p = 0.003$). Eine simultane Laserstrahlung bei 50 μ molar führte zu keiner statistisch signifikanten Zytotoxizitätssteigerung von Zolendronsäure ($p > 0.05$) (siehe Abbildung 6B).

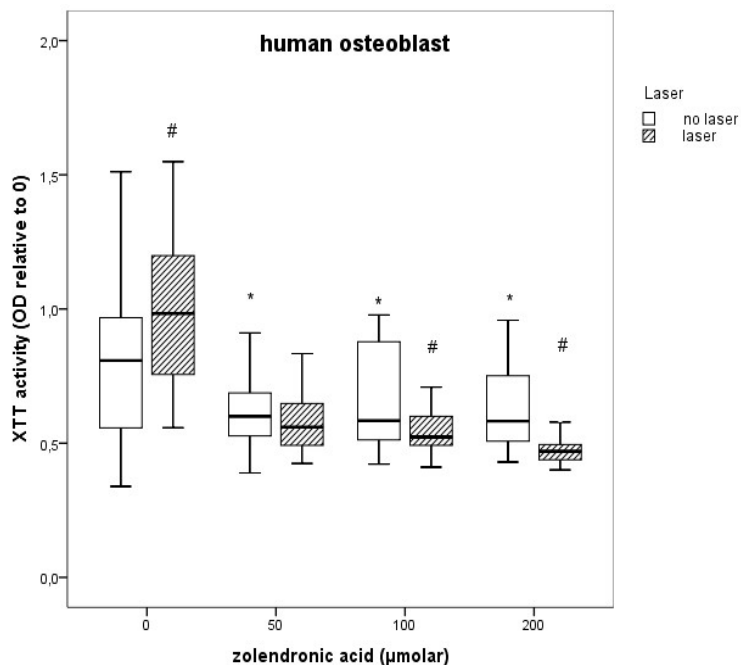


Abbildung 6A: XTT-Messung unter Inkubation mit Zolendronsäure

Ein Stern (*) steht für eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich der jeweiligen Konzentration von Zolendronsäure zur nicht behandelten Kontrollgruppe. Eine Raute (#) kennzeichnet eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich einer Laserstrahlung zur nicht bestrahlten Kontrollgruppe.

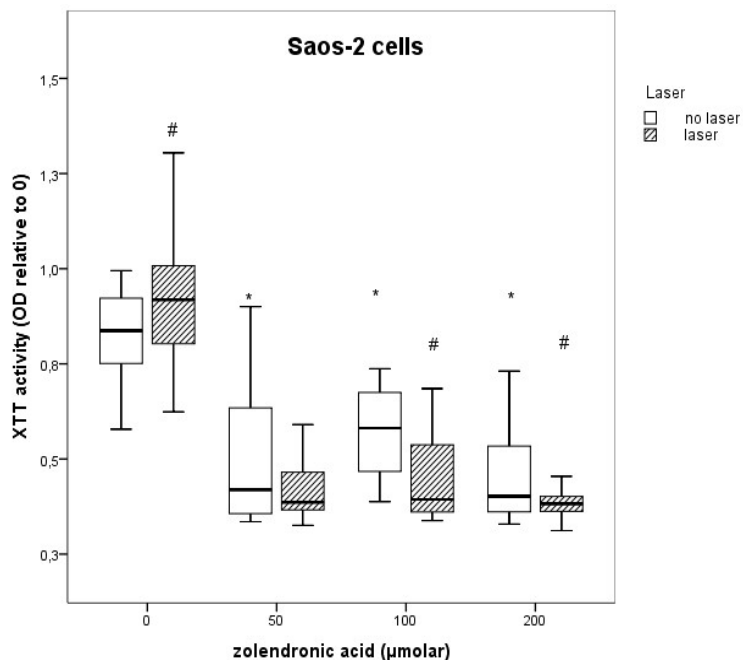


Abbildung 6B: XTT-Messung unter Inkubation mit Zolendronsäure

Ein Stern (*) steht für eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich der jeweiligen Konzentration von Zolendronsäure zur nicht behandelten Kontrollgruppe. Eine Raute (#) kennzeichnet eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich einer Laserstrahlung zur nicht bestrahlten Kontrollgruppe.

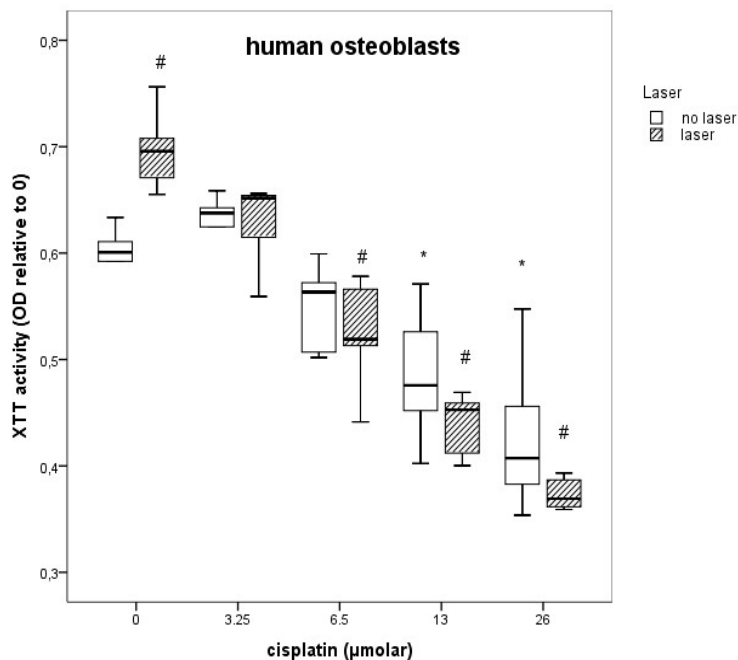


Abbildung 7A: XTT-Messung unter Inkubation mit Cisplatin

Ein Stern (*) steht für eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich der jeweiligen Konzentration von Cisplatin zur nicht behandelten Kontrollgruppe. Eine Raute (#) kennzeichnet eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich einer Laserstrahlung zur nicht bestrahlten Kontrollgruppe.

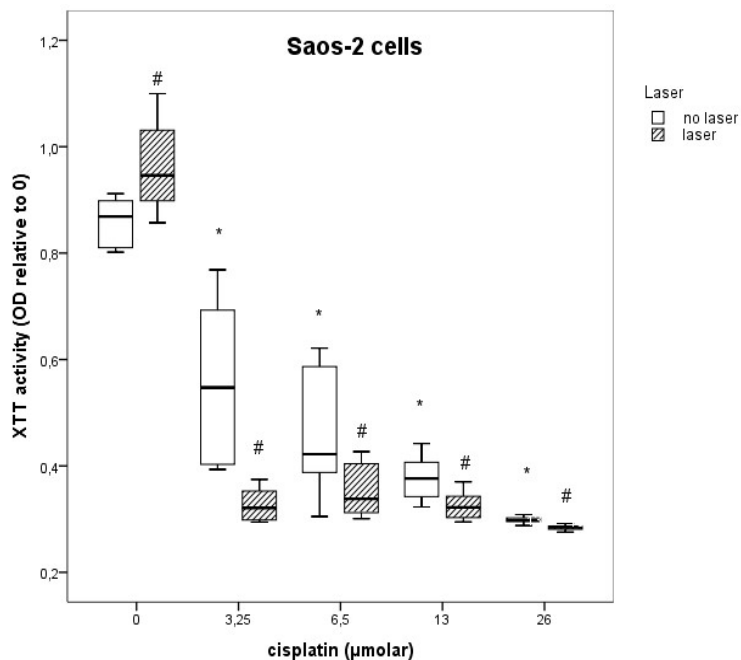


Abbildung 7B: XTT-Messung unter Inkubation mit Cisplatin

Ein Stern (*) steht für eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich der jeweiligen Konzentration von Cisplatin zur nicht behandelten Kontrollgruppe. Eine Raute (#) kennzeichnet eine Signifikanz mit einem p-Wert < 0,05 im Vergleich einer Laserstrahlung zur nicht bestrahlten Kontrollgruppe.

3.2. Histologie

3.2.1. Alleinige Lasertherapie

Weder primäre humane Osteoblasten noch Saos-2 Zellen zeigten histomorphologische Veränderungen.

3.2.2. Alleinige Chemotherapie

Bei humanen Osteoblasten ergaben sich charakteristische Anzeichen von Apoptose und Zellstress bei einer Inkubation mit Zolendronsäure (50, 100 und 200 μ molar) (siehe Abbildung 8A für 100 μ molar). Ähnliche morphologische Veränderungen wurden bei einer Inkubation mit den höchsten Konzentrationen von Cisplatin (13 und 26 μ molar) beobachtet (Siehe Abbildung 9A für 13 μ molar). Reduzierte Zellzahlen, vergrößerte Zellkerne und dünne Morphologie waren zu erkennen.

Bei Saos-2 Zellen zeigten sich bei einer alleinigen Exposition mit Zolendronsäure (50, 100 und 200 μ molar) Anzeichen von zellulärem Stress (siehe Abbildung 10A für 100 μ molar). Bei einer Inkubation mit Cisplatin (3,25, 6.5, 13 und 26 μ molar) ließen sich ähnliche morphologische Veränderungen beobachten. Bei höheren Konzentrationen von Cisplatin reduzierte sich die Zellzahl signifikant, gleichzeitig mit

verengten Zytoplasmen und anderen apoptotischen Anzeichen (siehe Abbildung 11A für 3,25 μ molar von Cisplatin).

3.2.3. Photoaktivierte Chemotherapie

Bei humanen Osteoblasten führte eine Laserstrahlung nach einer Exposition mit Zolendronsäure (100 und 200 μ molar) zur höherer Anzahl von apoptotischen Zellen im Vergleich zu den nicht-bestrahlten Kontrollgruppen (siehe Abbildung 8B für 100 μ molar). Der gleiche Effekt wurde für die bestrahlten Zellen nach einer Inkubation mit Cisplatin (13 und 26 μ molar) beobachtet (siehe Abbildung 9B für 13 μ molar).

Bei bestrahlten Saos-2 Zellen erhöhten sich die Anzeichen von Stress und Apoptose bei Konzentrationen 100 und 200 μ molar von Zolendronsäure (siehe Abbildung 10B für 100 μ molar). Ähnliche Änderungen wurden bei jeder Konzentration von Cisplatin beschrieben (siehe Abbildung 11B für 3,25 μ molar).

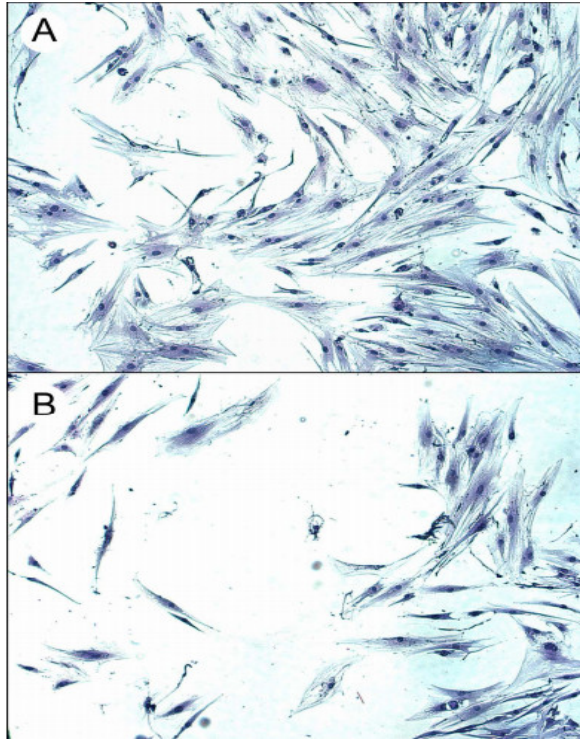


Abbildung 8: Histologische Untersuchung von humanen Osteoblasten

- A) 100 μ molar Zolendronsäure, ohne LLLT
B) 100 μ molar Zolendronsäure, mit LLLT
(20 Fache Vergrößerung) , H.E.- Färbung

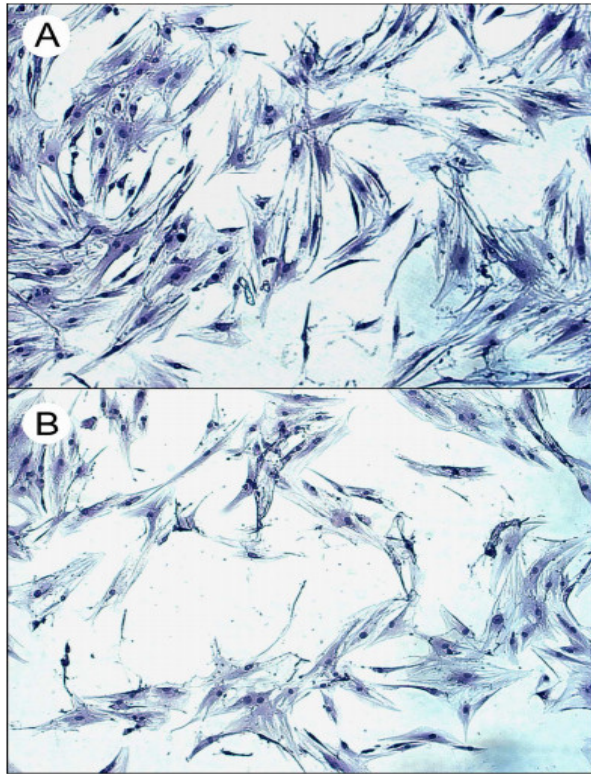
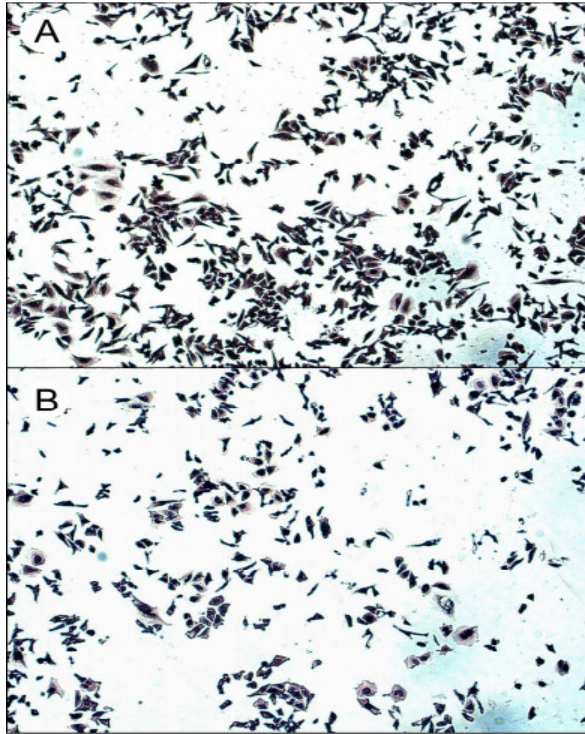


Abbildung 9: Histologische Untersuchung von humanen Osteoblasten

A) 13 μ molar cisplatin, ohne LLLT

B) 13 μ molar cisplatin, mit LLLT

(20 Fache Vergrößerung), H.E.- Färbung

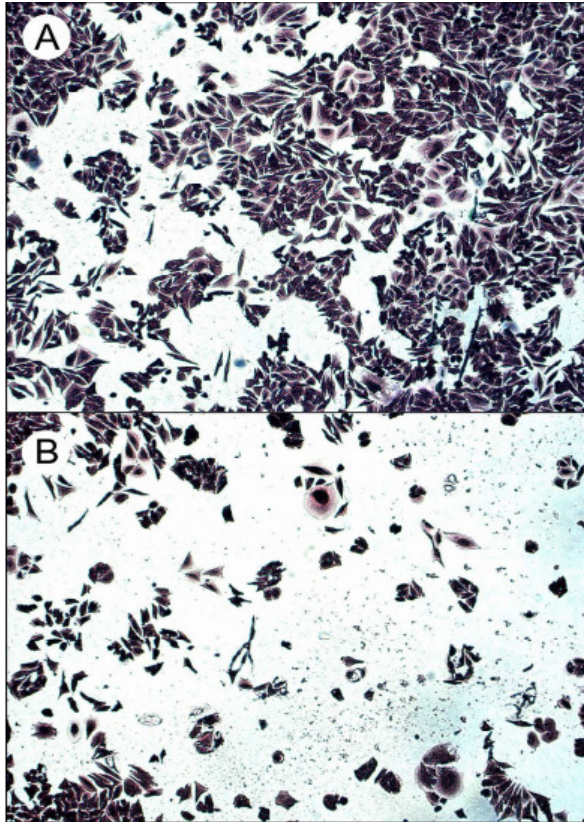


**Abbildung 10: Histologische Untersuchung von
Saos-2 Zellen**

A) 100 µmolar Zolendronsäure, ohne LLLT

B) 100 µmolar Zolendronsäure, mit LLLT

(20 Fache Vergrößerung) Saos-2 Zellen, H.E.- Färbung



**Abbildung 11: Histologische Untersuchung von Saos-2
Zellen**

A) 3.25 μ molar cisplatin, ohne LLLT

B) 3.25 μ molar cisplatin, mit LLLT

(20 Fache Vergrößerung) Saos-2 Zellen, H.E.- Färbung

4. Diskussion

4.1. Wirkung von Cisplatin oder Zolendronsäure auf die Zellbiiviabilität

Cisplatin und Zolendronsäure finden eine breite klinische Anwendung in der heutigen Onkologie. Cisplatin wird heute bei zahlreichen soliden Tumoren eingesetzt (Basu et al., 2010). Bisphosphonate wie Zolendronsäure wirken osteoprotektiv bei Osteoporose und ossären Metastasen (Russel et al., 2006). In einem Laborpilotversuch wurde der Einfluss einer Zusammensetzung von lokaler Chemotherapie mit Cisplatin oder Zolendronsäure mit einer lokalen Laserstrahlung auf den zellulären Metabolismus analysiert. Für diesen Zweck wurden in dieser Studie entweder primäre humane Osteoblasten (HOB) oder Osteosarkomzellen (Saos-2 Zellen) benutzt. Die beobachtete Abnahme der Zellbiiviabilität durch Zolendronsäure bei beiden Zelllinien wurde bereits vorher von anderen Arbeitsgruppen sowohl für humane Osteoblasten (Basso et al., 2013, Draenert et al. 2012; Patntirapong et al., 2012; Walter et al., 2011) als auch für Saos-2-Zellen beschrieben (Açil et al., 2012). Die in dieser Arbeit

beobachtete Zytotoxizität von Cisplatin über einen breiten Konzentrationsgradienten bei Saos-2 Zellen wurde zuvor von Incesuz et al. und Young et al. gezeigt (Incesuz et al., 2013; Young et al., 1997).

4.2. Einfluss einer Laserstrahlung auf die Zytotoxizität von Cisplatin oder Zolendronsäure

Es ist wenig bekannt, in welcher Art und Weise normale Knochenzellen und Knochentumorzellen auf Chemotherapeutika im Rahmen der Photochemotherapie reagieren. Durch eine Laserstrahlung verringerte sich die Zellbioviabilität der mit Bisphosphonaten inkubierten humanen Osteoblasten und Saos-2 Zellen. Die beobachtete Photosensibilisierung war jedoch bei beiden Zelllinien für Cisplatin im Vergleich zu Zolendronsäure deutlich ausgeprägter. Der zytotoxizitätssteigernde Effekt einer zusätzlichen Laserstrahlung wird in Literatur in Zusammenhang mit verschiedensten Laserbasierten Verfahren beschrieben. Beispielsweise hat eine Photodynamische Therapie (PDT), bei der ein Photosensibilisator durch Laserlicht spezifischer Wellenlänge aktiviert wird, eine verstärkende Wirkung auf die Zytotoxizität

von Cisplatin. Dieses wurde für Plattenepithelkarzinome in vivo von Uehara et al. (Uehara et al., 2006) und für Dickdarmkrebszellen in-vivo und in-vitro von Ge et al. postuliert (Ge et al., 2011). Weitere in-vivo-Forschungsarbeiten zeigten, dass Cisplatinwirkung durch Laserthermotherapie (Kanekal et al., 2009) oder interstitielle Lasertherapie verstärkt werden kann (Graeber et al., 1999). Eine additive Laserbestrahlung war in der Lage, die Zytotoxizität des angewandten Chemotherapeutikums fast an jeder Konzentration zu erhöhen. In der modernen Literatur ist diese Art von Therapieansatz als Laserphotochemotherapie bekannt (Saxton et al., 1995). Hierbei wird von verschiedenen Autorengruppen postuliert, dass Chemotherapeutika als potentielle Kandidaten für Licht- oder Wärmeaktivierung in Tumorzellen fungieren können (Paiva et al., 2011). Ähnliche Resultate konnten durch diese Arbeitsgruppe in einer vorherigen Arbeit gezeigt werden. Für Fibroblasten sowie für eine Plattenepithelkarzinomzelllinie wurde sowohl von Heymann et al. (Heymann et al., 2014) als auch von Volpato et al. für Fibroblasten (Volpato et al., 2011) ein toxizitätssteigernder Effekt für Cisplatin durch Laserbestrahlung belegt.

4.3. Biologische Erklärung für die Wirkung von Laserphotochemotherapie

Eine mögliche Erklärung könnte eine direkte mitochondriale Stimulation durch Low-Level-Lasertherapie (LLLT) sein. Als Schlüsselenzym gilt Cytochrom-c-Oxidase, die auch als ein endogener Photorezeptor beschrieben ist (Chung et al., 2012, Poyton et al., 2011). Dieses biologische Phänomen wird auch als Photobiomodulation bezeichnet (Agrawal et al., 2014).

4.4. Mögliche klinische Anwendung der Laserphotochemotherapie bei Knochentumoren

In einem Pilotprojekt wurde die Wirkung einer Lasersphotochemotherapie mit Cisplatin oder Zolendronsäure auf den Zellstoffwechsel von humanen benignen und malignen Knochenzellen untersucht. Eine mögliche klinische Indikation für dieses Konzept sind bösartige Knochentumoren wie Osteosarkom, das als Saos-2 Zellen in dieser Studie dargestellt ist. Das Kieferosteosarkom (OSJ) zeichnet sich durch eine hohe Rezidivrate (70%) und schlechte Reaktion auf die Chemotherapie aus. Insbesondere kann Cisplatin in Kombination mit Strahlentherapie langfristige Remissionen

verbessern (Errani et al., 2011). Basierend auf den Ergebnissen dieses Experimentes könnte eine Laserphotochemotherapie, zusammengesetzt aus Cisplatin oder Zolendronsäure und einer zusätzlichen lokalen Lasertherapie, zu einer Verbesserung der lokalen Tumorkontrolle führen. Als mögliches klinisches Konzept könnte eine intraoperative Brachytherapie nach einer neoadjuvanten Chemotherapie mit Cisplatin und/oder Zolendronsäure sein. Nach lokaler Tumoresektion wird das Operationsfeld durch Laserlicht oder implantierte Strahler, auch Seeds genannt, bestrahlt, was noch im Operationssitus verbliebenes Tumorrestgewebe abtöten könnte. Dieses neue Konzept könnte auch für die Therapie von anderen klinischen Manifestationen jenseits des Kiefers, wie beispielsweise bei langen Röhrenknochen von Interesse sein.

4.5. Schlussfolgerung

Bei gleichzeitiger Inkubation mit einem Zytostatikum erhöhte die Laserstrahlung seine Toxizität. Im Gegensatz dazu aktivierte die alleinige Strahlung den zellulären Stoffwechsel. Aufgrund des Studienmodells mit zwei verschiedenen Zelllinien und zwei verschiedenen Zytostatika könnte postuliert

werden, dass der beobachtete Effekt zytostatika- wie auch zelltypunabhängig sein könnte. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte ein unmittelbarer Einfluss der Laserstrahlung auf die Mitochondrien sein. Möglicherweise ist diese Bestrahlungsform im Stande, die mitochondriale Atmungskette direkt zu aktivieren. Die festgestellte Zytotoxizitätszunahme von Cisplatin sowie Zolendronsäure lässt sich eventuell durch eine erhöhte mitochondriale Aktivität erklären.

Um dies genauer zu klären, sollten weitere Untersuchungen besonders auf subzellulärer Ebene folgen. Darüber hinaus wäre es interessant, andere Zelllinien kombiniert mit anderen Laserstrahlungsdosen sowie anderen Zytostatika zu testen. Durch die in dieser Studie festgestellte Toxizitätszunahme von Cisplatin sowie Zolendronsäure könnten sich neue Therapiekonzepte in der Behandlung von Knochentumoren im Kopf-Hals-Bereich entwickeln.

5. Zusammenfassung/Summary

5.1. Zusammenfassung

Heutzutage findet eine alleinige Laserstrahlung (Low-Level-Lasertherapie) als lokal-konservative Therapie medizinische Anwendung, indem sie zur Förderung der Wundheilung und Verringerung der Entzündungen führt. Dies wird versucht durch eine direkte biostimulative Wirkung der Laserstrahlung auf die Mitochondrien zu erklären. Diesen Prozess bezeichnet man als Photobiomodulation. Die photodynamische Therapie (PDT) beruht auf einer kombinierten Nutzung von einem Photosensibilisator und der Laserstrahlung. In der Dermatologie wird sie zur Behandlung von Hautveränderungen eingesetzt. Darüber hinaus wird sie in der Zahnmedizin bei Endodontitiden, Parodontitiden und Periimplantitiden als antimikrobielle photodynamische Therapie verwendet. Diese Studie untersucht die Wirkung einer Kombination von LLLT mit einem Chemotherapeutikum (Cisplatin oder Zolendronsäure) in-vitro auf den zellulären Metabolismus. Dazu wurden primäre humane Osteoblasten und Knochen-Tumorzellen (Saos-2 Zelllinie) mit zunehmenden

Konzentrationen von Cisplatin oder Zolendronsäure inkubiert und dann mit Diodenlaser (670 nm, 2 Minuten, 100mW/cm²) bestrahlt. Danach erfolgte entweder eine Zellviabilitätsmessung mittels XTT-Assay oder eine histologische Untersuchung durch eine H.E.-Färbung.

Im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrollgruppe erhöht eine alleinige Laserbestrahlung den Metabolismus der beiden Zelllinien. Nach Vorbehandlung mit Cisplatin oder Zolendronsäure war eine strahlenbedingte Toxizitätszunahme im Vergleich zur nicht bestrahlten Kontrolle erkennbar. Die Osteoblasten zeigten eine geringere Photosensibilität für Cisplatin im Vergleich zur Saos-2 Tumorzelllinie. Im Vergleich zu einer alleinigen Vorbehandlung mit Cisplatin reduzierte sich die Bioviabilität der beiden Zelllinien durch eine gleichzeitige Laserbestrahlung. Nur bei den höchsten Konzentrationen von Zolendronsäure erfolgte die strahleninduzierte Toxizitätszunahme bei den beiden Zellen. In der histologischen Untersuchung spiegelten sich diese Ergebnisse wieder. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine LLLT zu einer Toxizitätszunahme von einem lokal applizierten Chemotherapeutikum führen kann. Daraus könnten sich neue Therapieansätze für Knochentumoren und -Zysten im Mund-, Kiefer- und Gesichtsbereich entwickeln.

5.2. Summary

Nowadays, the low level laser therapy is used as locally conservative therapy in medical applications, by leading to promote wound healing and reduce inflammation. This is done by a direct effect of the biostimulative laser irradiation on the mitochondria. This process is referred to as Photobiomodulation. Photodynamic therapy (PDT) is based on a combined using of a photosensitizer and the laser irradiation. In dermatology it is used for the treatment of skin lesions. In addition, it is used in dentistry in the treatment of root canals, periodontitis and periimplantitis as antimicrobial photodynamic therapy. This study aims to study the effect of a combination of LLLT with chemotherapy (cisplatin or zoledronic acid) in vitro on cellular metabolism. For this purpose, primary human osteoblasts and bone tumor cells (Saos-2 cell line) were incubated with different concentrations of cisplatin or zoledronic acid and then were irradiated twice with a diode laser (670 nm, 2 minutes, 100mW/cm^2). This was followed by either XTT assay (cell viability test) or histological examination by HE staining.

Compared to the non-irradiated control group, a single laser irradiation increased metabolism of both cell lines. After pretreatment with cisplatin or zoledronic acid the radiation-

induced cytotoxicity was clearly recognizable compared to the non-irradiated control. The osteoblasts showed lower photosensitivity for cisplatin compared to Saos-2 tumor cell line. In cases of pretreatment with cisplatin the viability of the two cell lines has been reduced by their simultaneous laser irradiation. The increased radiation-induced toxicity occurred only by the highest concentrations of zoledronic acid. These results were reflected in the histological examination as well. LLLT can lead to an increase of toxicity of local applied chemotherapeutic agent. This can be of therapeutic interest in the development of new therapeutic approaches for bone tumors and cysts in the oral and maxillofacial region.

6. Literaturverzeichnis (In alphabetischer Ordnung)

Adami S, Zamberlan N. Adverse effects of bisphosphonates. A comparative review. *Drug Saf.* 1996 Mar;14(3):158-70.

Adwani D, Bhattacharya A, Adwani N, Adwani R, Sharma VW. Massive recurrent chondroblastic osteosarcoma of maxilla: a rare case report. *J Clin Diagn Res.* 2014 Jan;8(1):288-90.

Açil Y, Möller B, Niehoff P, Rachko K, Gassling V, Wiltfang J, Simon MJ. The cytotoxic effects of three different bisphosphonates in-vitro on human gingival fibroblasts, osteoblasts and osteogenic sarcoma cells. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012 Dec;40(8):e229-35.

Agrawal T, Gupta GK, Rai V, Carroll JD, Hamblin MR. Pre-conditioning with low-level laser (light) therapy: light before the storm. *Dose Response.* 2014 Sep 22;12(4):619-49.

Al-Bahlani S, Fraser M, Wong AY, Sayan BS, Bergeron R, Melino G, Tsang BK. P73 regulates cisplatin-induced apoptosis

in ovarian cancer cells via a calcium/calpain-dependent mechanism. *Oncogene*. 2011 Oct 13;30(41):4219-30.

Alan H Lau. Apoptosis induced by cisplatin nephrotoxic injury. *Kidney International*. 1999 56, 1295–1298.

Algur E, Macklis RM, Häfeli UO. Synergistic cytotoxic effects of zoledronic acid and radiation in human prostate cancer and myeloma cell lines. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2005 Feb 1;61(2):535-42.

Allison RR and Moghissi K. Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms. *Clin Endosc* 2013; 46(1): 24-9.

Amini Shakib P, Foroughi R, Seyedmajidi M. Osteosarcoma of the maxilla: a rare case with unusual clinical presentation. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2013;7(3):177-81.

Ana-Maria Florea and Dietrich Büsselberg. Cisplatin as an Anti-Tumor Drug: Cellular Mechanisms of Activity, Drug Resistance and Induced Side Effects. *Cancers (Basel)*. 2011 Mar; 3(1): 1351–1371.

Anastasilakis AD, Polyzos SA, Makras P, Sakellariou GT, Bisbinas I, Gkiomisi A, Delaroudis S, Gerou S, Ballaouri I, Oikonomou D and Papapoulos SE. Acute phase response following intravenous zoledronate in postmenopausal women with low bone mass. *Bone* 2012; 50(5): 1130-4.

Andrews P and Howell S. Cellular pharmacology of cisplatin: Perspectives on mechanisms of acquired resistance. *Cancer Cells*. 1990; 2(2):35-43.

Angiero F, Moltrasio F, Cattoretti G, Valente MG. Clinical and histopathological profile of primary or secondary osteosarcoma of the jaws. *Anticancer Res*. 2011 Dec;31(12):4485-9.

Antunes HS, Herchenhorn D, Small IA, Araújo CM, Viégas CM, Cabral E, Rampini MP, Rodrigues PC, Silva TG, Ferreira EM, Dias FL, Ferreira CG. Phase III trial of low-level laser therapy to prevent oral mucositis in head and neck cancer patients treated with concurrent chemoradiation. *Radiother Oncol*. 2013 Nov;109(2):297-302.

Argon A, Doğanavşargıl B, Ünal Yıldırım F, Sezak M, Midilli R, Öztıp F. Osteosarcomas of jaw: experience of a single centre.

J Plast Surg Hand Surg. 2015 Feb;49(1):13-8.

Arora P, Rehman F, Girish KL, Kalra M. Osteosarcoma of mandible: Detailed radiographic assessment of a case. Contemp Clin Dent. 2013 Jul;4(3):382-5.

Asta Juzeniene, Johan Moana. The history of PDT in Norway. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy (Impact Factor: 2.01). 06/2007; 4(2):80-87.

Avci P, Erdem SS, Hamblin MR. Photodynamic therapy: one step ahead with self-assembled nanoparticles. J Biomed Nanotechnol. 2014 Sep;10(9):1937-52.

Basset-Seguin N. PDT panoramic view. Principle, photosensitizers, light sources and validated indications in dermatology. Ann Dermatol Venereol. 2013 Nov;140 Suppl 2:223-8.

Bassetti M, Schär D, Wicki B, Eick S, Ramseier CA, Arweiler NB, Sculean A, Salvi GE. Anti-infective therapy of peri-implantitis with adjunctive local drug delivery or photodynamic therapy: 12-month outcomes of a randomized controlled

clinical trial. Clin Oral Implants Res. 2014 Mar;25(3):279-87.

Basso FG, Silveira Turrioni AP, Hebling J, de Souza Costa CA. Zoledronic acid inhibits human osteoblast activities. Gerontology. 2013;59(6):534-41.

Basu A and Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. J Nucleic Acids 2010: 2010.

Basu S, Shet T, Awasare S. Bilateral adrenal metastases and metastatic subcutaneous deposit in the chest wall from osteosarcoma of the mandible: utility of 18F-FDG-PET. Hell J Nucl Med. 2009 Jan-Apr;12(1):51-4.

Baumhoer D, Brunner P, Eppenberger-Castori S, Smida J, Nathrath M, Jundt G. Osteosarcomas of the jaws differ from their peripheral counterparts and require a distinct treatment approach. Experiences from the DOESAK Registry. Oral Oncol. 2014 Feb;50(2):147-53.

Bednarski PJ, Mackay FS, Sadler PJ. Photoactivatable platinum complexes. Anticancer Agents Med Chem. 2007 Jan;7(1):75-93.

Belletti S, Uggeri J, Mergoni G, Vescovi P, Merigo E, Fornaini C, Nammour S, Manfredi M, Gatti R. Effects of 915 nm GaAs diode laser on mitochondria of human dermal fibroblasts: analysis with confocal microscopy. *Lasers Med Sci*. 2015 Jan;30(1):375-81.

Benford HL, McGowan NW, Helfrich MH, Nuttall ME, Rogers MJ. Visualization of bisphosphonate-induced caspase-3 activity in apoptotic osteoclasts in vitro. *Bone*. 2001 May;28(5):465-73.

Bielack S, Jürgens H, Jundt G, Kevric M, Kühne T, Reichardt P, Zoubek A, Werner M, Winkelmann W, Kotz R. Osteosarcoma: the COSS experience. *Cancer Treat Res*. 2009;152:289-308.

Brancaleon L and Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2002; 17(3): 173-86.

Bras J. Dissertations 25 years after the date 13. Sarcomas of the jaws. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 2007 Feb;114(2):87-92.

Caraglia M, Santini D, Marra M, Vincenzi B, Tonini G and Budillon A. Emerging anticancer molecular mechanisms of aminobisphosphonates. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13(1): 7-26.

Celia Casares, Rafael Ramírez-Camacho, Almudena Trinidad, Amaya Roldán, Eduardo Jorge, José Ramón García-Berrocal. Reactive oxygen species in apoptosis induced by cisplatin: review of physiopathological mechanisms in animal models. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*. December 2012, Volume 269, Issue 12, pp 2455-2459.

Chaudhary M and Chaudhary SD. Osteosarcoma of jaws. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012 May-Aug; 16(2): 233–238.

Chidzonga MM, Mahomva L. Osteosarcoma of the jaws: a 23 year retrospective review. *Cent Afr J Med*. 2009 May-Aug;55(5-8):40-3.

Chung H, Dai T, Sharma SK, Huang YY, Carroll JD, Hamblin MR. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy. *Ann Biomed Eng*. 2012 Feb;40(2):516-33.

Coxon FP, Helfrich MH, Van't Hof R, Sehti S, Ralston SH, Hamilton A, Rogers MJ. Protein geranylgeranylation is required for osteoclast formation, function, and survival: inhibition by bisphosphonates and GGTI-298. *J Bone Miner Res.* 2000 Aug;15(8):1467-76.

Cummings BS, Schnellmann RG. Cisplatin-induced renal cell apoptosis: caspase 3-dependent and -independent pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Jul;302(1):8-17.

Draenert GF, Huetzen DO, Kämmerer PW, Palarie V, Nacu V, Wagner W. Dexrazoxane shows cytoprotective effects in zoledronic acid-treated human cells in vitro and in the rabbit tibia model in vivo. *J Craniomaxillofac Surg.* 2012 Dec;40(8):e369-74.

Eckel F, Schmid RM. Chemotherapy in advanced biliary tract carcinoma: a pooled analysis of clinical trials. *Br J Cancer.* 2007 Mar 26;96(6):896-902.

Errani C, Longhi A, Rossi G, Rimondi E, Biazzo A, Toscano A, Ali N, Ruggieri P, Alberghini M, Picci P, Bacci G, Mercuri M.

Palliative therapy for osteosarcoma. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2011 Feb;11(2):217-27.

Fang Z, Jin S, Zhang C, Wang L, He Y. Misdiagnosis of osteosarcoma as cementoblastoma from an atypical mandibular swelling: A case report. *Oncol Lett.* 2016 Jun;11(6):3761-3765.

Farhad Hamad Mustafa, Mohamad Suhaimi Jaafar. Comparison of wavelength-dependent penetration depths of lasers in different types of skin in photodynamic therapy. *Indian Journal of Physics.* 11/2012; 87(3).

Farivar S, Malekshahabi T, Shiari R. Biological effects of low level laser therapy. *J Lasers Med Sci.* Spring. 2014;5(2):58-62.

Forteza G, Colmenero B, López-Barea F. Osteogenic sarcoma of the maxilla and mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1986 Aug;62(2):179-84.

Frith JC, Rogers MJ. Antagonistic effects of different classes of bisphosphonates in osteoclasts and macrophages in vitro. *J Bone Miner Res.* 2003 Feb;18(2):204-12.

Galea AM, Murray V. The anti-tumour agent, cisplatin, and its clinically ineffective isomer, transplatin, produce unique gene expression profiles in human cells. *Cancer Inform.* 2008;6:315-55.

Ge R, Ahn JC, Shin JI, Bahk CW, He P, Chung PS. An in vitro and in vivo study of combination therapy with Photogem(R)-mediated photodynamic therapy and cisplatin on mouse cancer cells (CT-26). *Photomed Laser Surg* 2011; 29: 155-160.

Gerressen M, Donner A, Jundt G, Jänicke S, Smeets R, Riediger D, Ghassemi A. High-grade osteosarcoma of the maxillary sinus. A case report. *Mund Kiefer Gesichtschir.* 2006 Sep;10(5):347-52.

Go RS, Adjei AA. Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol.* 1999 Jan;17(1):409-22.

Godwin AK, Meister A, O'Dwyer PJ, Huang CS, Hamilton TC, and Anderson ME. High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of

glutathione synthesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992 Apr 1; 89(7): 3070–3074.

Gomer CJ, Ferrario A, Luna M, Rucker N, Wong S. Photodynamic therapy: combined modality approaches targeting the tumor microenvironment. Lasers Surg Med. 2006 Jun;38(5):516-21.

Gong JG, Costanzo A, Yang HQ, Melino G, Kaelin WG Jr, Levvero M, Wang JY. The tyrosine kinase c-Abl regulates p73 in apoptotic response to cisplatin-induced DNA damage. Nature. 1999;399(6738):806-9.

Graeber IP, Eshraghi AA, Paiva MB, Paek WH, Castro DJ, Jovanovic S, Scherer H, Soudant J, Saxton RE. Combined intratumor cisplatin injection and Nd:YAG laser therapy. Laryngoscope. 1999 Mar;109(3):447-54.

Guadagnolo BA, Zagars GK, Raymond AK, Benjamin RS, Sturgis EM. Osteosarcoma of the jaw/craniofacial region: outcomes after multimodality treatment. Cancer. 2009 Jul 15;115(14):3262-70.

Gursoy H, Ozcakil-Tomruk C, Tanalp J, Yilmaz S. Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. Clin Oral Investig. 2013 May;17(4):1113-25.

Haddox CL, Han G, Anijar L, O. Binitie, G. D. Letson, M. M. Bui, and D. R. Reed. Osteosarcoma in pediatric patients and young adults: a single institution retrospective review of presentation, therapy, and outcome. Sarcoma Volume 2014 (2014), 402509.

Hatano H, Morita T, Kobayashi H, Ito T, Segawa H, Hasegawa S. Extraskelatal osteosarcoma of the jaw. Skeletal Radiol. 2005 Mar;34(3):171-5.

Heringova P, Woods J, Mackay FS, Kasparkova J, Sadler PJ, Brabec V. Transplatin is cytotoxic when photoactivated: enhanced formation of DNA cross-links. J Med Chem. 2006 Dec 28;49(26):7792-8.

Hersant B, SidAhmed-Mezi M, Bosc R, Meningaud JP. Current indications of low-level laser therapy in plastic surgery: a review. Photomed Laser Surg. 2015 May;33(5):283-97.

Heymann PG, Mandic R, Kämmerer PW, Kretschmer F, Saydali A, Neff A, Draenert FG. Laser-enhanced cytotoxicity of zoledronic acid and cisplatin on primary human fibroblasts and head and neck squamous cell carcinoma cell line UM-SCC-3. J Craniomaxillofac Surg. 2014 Oct;42(7):1469-74.

Hoff AO, Toth BB, Altundag K, Johnson MM, Warneke CL, Hu M, Nooka A, Sayegh G, Guarneri V, Desrouleaux K, Cui J, Adamus A, Gagel RF, Hortobagyi GN. Frequency and risk factors associated with osteonecrosis of the jaw in cancer patients treated with intravenous bisphosphonates. J Bone Miner Res. 2008 Jun;23(6):826-36.

Ide Y. Light irradiator for various chronic pain. Masui. 2014 Jul;63(7):759-65.

Incesu Z, Hatipoglu I, Sivas H, Ergene E, Ciftci GA. Effects of fibronectin and type IV collagen on osteosarcoma cell apoptosis. Indian J Exp Biol 2013; 51: 789-796

Issa MC and Manela-Azulay M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. An Bras Dermatol 2010; 85(4): 501-11.

Jagdev SP, Coleman RE, Shipman CM, Rostami-H A, Croucher PI. The bisphosphonate, zoledronic acid, induces apoptosis of breast cancer cells: evidence for synergy with paclitaxel. *Br J Cancer*. 2001 Apr 20;84(8):1126-34.

Javad T. Hashmi, Ying-Ying Huang, Bushra Z. Osmani, Sulbha K. Sharma, Margaret A. Naeser and Michael R. Hamblin. Role of Low-Level Laser Therapy in Neurorehabilitation. *PM R*. 2010 Dec; 2(12 Suppl 2): S292–S305.

Javed F, Samaranayake LP, Romanos GE. Treatment of oral fungal infections using antimicrobial photodynamic therapy: a systematic review of currently available evidence. *Photochem Photobiol Sci*. 2014 May;13(5):726-34.

Jia S, Li B. Osteosarcoma of the jaws: case report on synchronous multicentric osteosarcomas. *J Clin Diagn Res*. 2014 Jun;8(6):ZD01-3.

Jitendra V. Kalburge, Sunil K. Sahuji, Vaishali Kalburge, and Yogesh Kini. Osteosarcoma of Mandible. *J Clin Diagn Res*. 2012 Nov; 6(9): 1597–1599.

Jones RH, Vasey PA. Part II: testicular cancer--management of advanced disease. *Lancet Oncol.* 2003 Dec;4(12):738-47.

Kanekal S, Joo J, Bublik M, Bababeygy A, Loh C, Castro DJ, Sercarz JA, Paiva MB. Retention of intratumor injections of cisplatin in murine tumors and the impact on laser thermal therapy for cancer treatment. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2009 Feb;266(2):279-84.

Kang HS, Lee JW, Kim JS. Dental sinus tracts mimicking scrofuloderma: cutaneous presentation of underlying bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. *Clin Exp Dermatol.* 2011 Aug;36(6):624-7.

Katsumi H, Kusamori K, Sakane T, Yamamoto A. Development of delivery system of bisphosphonates for the treatment of osteoporosis. *Yakugaku Zasshi.* 2010 Sep;130(9):1129-33.

Knut A. Grötz, Ingo J. Diel. Fortbildungsreihe Supportivtherapie, Folge 38 Osteonekrose des Kiefers unter Bisphosphonat-Langzeittherapie. *Im Focus Onkologie.* 2005/3: 52-55.

Kostovic K, Pastar Z, Ceovic R, Mokos ZB, Buzina DS and Stanimirovic A. Photodynamic therapy in dermatology: current treatments and implications. Coll Antropol 2012; 36(4): 1477-81.

Kreutle V, Blum C, Meier C, Past M, Müller B, Schütz P, Borm K. Bisphosphonate induced hypocalcaemia - report of six cases and review of the literature. Swiss Med Wkly. 2014 Jun 25;144:w13979.

Landthaler M, Szeimies RM, Hohenleutner U. Laser therapy of skin tumors. Recent Results Cancer Res. 1995;139:417-21.

Leonardo M. Moreira, Juliana P. Lyon, Ana Paula Romani, Divinomar Severino, Maira Regina Rodrigues and Hueder P. M. de Oliveira. Phenotiazinium Dyes as Photosensitizers (PS) in Photodynamic Therapy (PDT): Spectroscopic Properties and Photochemical Mechanisms. Intech: 2012. DOI: 10.5772/48087.

Levy JG. Photosensitizers in photodynamic therapy. Semin Oncol. 1994 Dec;21(6 Suppl 15):4-10.

Li QQ, Lee RX, Liang H, Wang G, Li JM, Zhong Y, Reed E. β -Elemene enhances susceptibility to cisplatin in resistant ovarian carcinoma cells via downregulation of ERCC-1 and XIAP and inactivation of JNK. *Int J Oncol*. 2013 Sep;43(3):721-8.

Lin JH. Bisphosphonates: a review of their pharmacokinetic properties. *Bone*. 1996 Feb;18(2):75-85.

Mansfield R, Bown S, McEwan J. Photodynamic therapy: shedding light on restenosis. *Heart*. 2001 Dec;86(6):612-8.

Mansoori LS, Catel CP, Rothman MS. Bisphosphonate treatment in polyostotic fibrous dysplasia of the cranium: case report and literature review. *Endocr Pract*. 2010 Sep-Oct;16(5):851-4.

Mardinger O, Givol N, Talmi YP, Taicher S. Osteosarcoma of the jaw. The Chaim Sheba Medical Center experience. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Apr;91(4):445-51.

Maricic M. Zoledronic acid for Paget's disease of bone. *Drugs Today (Barc)*. 2007 Dec;43(12):879-85.

Mawardi H, Treister N, Richardson P, Anderson K, Munshi N, Faiella RA, Woo SB. Sinus tracts--an early sign of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws? *J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Mar;67(3):593-601.

Mazer JM. Indications for medical lasers in dermatology. *Presse Med*. 2002 Feb 9;31(5):223-31.

McKeage K, Plosker GL. Zoledronic acid: a pharmacoeconomic review of its use in the management of bone metastases. *Pharmacoeconomics*. 2008;26(3):251-68.

Meier D, Campanile C, Botter SM, Born W, Fuchs B. Cytotoxic efficacy of photodynamic therapy in osteosarcoma cells in vitro. *J Vis Exp*. 2014 Mar 18;(85).

Menon S, Venkatswamy S, Ramu V, Banu K, Ehtai S, Kashyap VM. Craniofacial fibrous dysplasia: Surgery and literature review. *Ann Maxillofac Surg*. 2013 Jan;3(1):66-71.

Misso G, Porru M, Stoppacciaro A, Castellano M, De Cicco F, Leonetti C, Santini D, Caraglia M. Evaluation of the in vitro and in vivo antiangiogenic effects of denosumab and zoledronic acid. *Cancer Biol Ther.* 2012 Dec;13(14):1491-500.

Mlcouskova J, Stepankova J, Brabec V. Antitumor carboplatin is more toxic in tumor cells when photoactivated: enhanced DNA binding. *J Biol Inorg Chem.* 2012 Aug;17(6):891-8.

Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol.* 1991 Apr;53(4):549-53.

Modarressi Ghavami SA, Lombardi T, Becker M, Richter M. Chondroblastic osteosarcoma of the mandible: a case report with 14 years follow-up. *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* 2006 Nov;107(5):380-5.

Moharamzadeh K, Van Noort R, Brook IM, Scutt AM. Cytotoxicity of resin monomers on human gingival fibroblasts and HaCaT keratinocytes. *Dent Mater.* 2007 Jan;23(1):40-4.

Molvik H, Khan W. Bisphosphonates and their influence on

fracture healing: a systematic review. *Osteoporos Int.* 2015 Apr;26(4):1251-60.

Nakamura T, Ebihara S, Ohkuni I, Izukura H, Harada T, Ushigome N, Ohshiro T, Musha Y, Takahashi H, Tsuchiya K, Kubota A. Low Level Laser Therapy for chronic knee joint pain patients. *Laser Ther.* 2014 Dec 27;23(4):273-7.

Neidle S, Read MA. G-quadruplexes as therapeutic targets. *Biopolymers.* 2000-2001;56(3):195-208.

Nissanka EH, Amaratunge EA, Tilakaratne WM. Clinicopathological analysis of osteosarcoma of jaw bones. *Oral Dis.* 2007 Jan;13(1):82-7.

Nye AM, Hamrick I, Rauch A, Pound MW, Shelton PS. Documenting the use of calcium supplements with oral bisphosphonates. *Consult Pharm.* 2013 Jan;28(1):31-8.

O'Brien V, Brown R. Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR System. *Carcinogenesis.* 2006 Apr;27(4):682-92.

Paiva MB, Joo J, Abrahao M, Ribeiro JC, Cervantes O, Sercarz JA. Anticancer Agents Med Chem. 2011 Oct;11(8):772-9. Update on laser photochemotherapy: an alternative for cancer treatment.

Pandeshwar P, Roa MD, Das R, Shastri SP, Kaul R, Srinivasreddy MB. Photobiomodulation in oral medicine: a review. J Investig Clin Dent. 2015 Feb 26.

Patntirapong S, Singhatanadgit W, Chanruangvanit C, Lavanrattanakul K, Satravaha Y. Zoledronic acid suppresses mineralization through direct cytotoxicity and osteoblast differentiation inhibition. J Oral Pathol Med. 2012 Oct;41(9):713-20.

Pazianas M, Miller P, Blumentals WA, Bernal M, Kothawala P. A review of the literature on osteonecrosis of the jaw in patients with osteoporosis treated with oral bisphosphonates: prevalence, risk factors, and clinical characteristics. Clin Ther. 2007 Aug;29(8):1548-58.

Pizarro AM, Sadler PJ. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. Biochimie. 2009 Oct;91(10):1198-211.

Poyton RO, Ball KA. Therapeutic photobiomodulation: nitric oxide and a novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase. *Discov Med* 2011; 11: 154-159.

T. Prietzel und G. von Salis-Soglio. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC) und des Berufsverbandes der Ärzte für Orthopädie (BVO) AWMF-Leitlinien-Register Nr. 033/038: 13. Juli 2003.

Ravosa MJ, Ning J, Liu Y, Stack MS. Bisphosphonate effects on the behaviour of oral epithelial cells and oral fibroblasts. *Arch Oral Biol.* 2011 May;56(5):491-8.

Reed E. Nucleotide excision repair and anti-cancer chemotherapy. *Cytotechnology.* 1998 Sep;27(1-3):187-201.

Reid IR. Osteonecrosis of the jaw: who gets it, and why? *Bone.* 2009 Jan;44(1):4-10.

Rha SY, Chung HC, Gong SJ, Shim KY, Ahn JB, Yang WI, Shin KH, Yoo NC, Kim JH, Roh JK, Lee CI, Kim BS. Combined pre-operative chemotherapy with intra-arterial cisplatin and

continuous intravenous adriamycin for high grade osteosarcoma. *Oncol Rep.* 1999 May-Jun;6(3):631-7.

Rkein AM, Ozog DM. Photodynamic therapy. *Dermatol Clin.* 2014 Jul;32(3):415-25.

Rodan GA, Reszka AA. Bisphosphonate mechanism of action. *Curr Mol Med.* 2002 Sep;2(6):571-7.

Rojas JC, Gonzalez-Lima F. Neurological and psychological applications of transcranial lasers and LEDs. *Biochem Pharmacol.* 2013 Aug 15;86(4):447-57.

Rosenberg B, Van Camp L, Krigas T. Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode. *Nature.* 1965 Feb 13;205:698-9.

Rosenberg B, Van Camp L, Trosko JE and Mansour VH. Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents. *Nature* 1969; 222(5191): 385-6.

Russell RG. Bisphosphonates: from bench to bedside. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1068: 367-401.

Samraj L, Kaliamoorthy S, Venkatapathy R, Oza N. Osteosarcoma of the mandible: A case report with an early radiographic manifestation. *Imaging Sci Dent.* 2014 Mar;44(1):85-8.

Saxton RE, Paiva MB, Lufkin RB, Castro DJ. Laser photochemotherapy: a less invasive approach for treatment of cancer. *Semin Surg Oncol.* 1995 Jul-Aug;11(4):283-9.

Schneider M, Kirfel G, Berthold M, Frentzen M, Krause F and Braun A. The impact of antimicrobial photodynamic therapy in an artificial biofilm model. *Lasers Med Sci* 2012; 27(3): 615-20.

Shaili E. Platinum anticancer drugs and photochemotherapeutic agents: recent advances and future developments. *Sci Prog.* 2014;97(Pt 1):20-40.

Sherman-Baust CA, Weeraratna AT, Rangel LB, Pizer ES, Cho KR, Schwartz DR, Shock T and Morin PJ. Remodeling of the extracellular matrix through overexpression of collagen VI contributes to cisplatin resistance in ovarian cancer cells. *Cancer Cell* 2003; 3(4): 377-86.

Sibata CH, Colussi VC, Oleinick NL, Kinsella TJ. Photodynamic therapy in oncology. *Expert Opin Pharmacother*. 2001 Jun;2(6):917-27.

Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*. 2003 Oct 20;22(47):7265-79.

Soares RC, Soares AF, Souza LB, Santos AL, Pinto LP. Osteosarcoma of mandible initially resembling lesion of dental periapex: a case report. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2005 Mar-Apr;71(2):242-5.

Spivakovsky S. Low level laser therapy may reduce risk of oral mucositis. *Evid Based Dent*. 2015 Jun;16(2):49.

Stein A, Benayahu D, Maltz L, Oron U. Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomed Laser Surg* 2005 Apr;23(2):161-6.

Sturgis EM, Potter BO. Sarcomas of the head and neck region. *Curr Opin Oncol*. 2003 May;15(3):239-52.

Tai N, Inoue D. Treatment of malignancy associated hypercalcemia. Clin Calcium. 2014 Aug;24(8):1223-8.

Takahara PM, Rosenzweig AC, Frederick CA, Lippard SJ. Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin. Nature 377, 649 - 652 (19 October 2002).

Tazoe Sakae, Miike Akira. Method and reagent for quantitative determination of 1,5 anhydroglucitol. Bulletin 2000/24.

Tirelli G, Biasotto M, Chiandussi S, Dore F, De Nardi E, Di Lenarda R. Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: the limits of a conservative approach. Head Neck. 2009 Sep;31(9):1249-54.

Trimmer EE, Essigmann JM. Cisplatin. Essays Biochem. 1999;34:191-211.

Tsang, R.Y.; Al-Fayea, T.; Au, H.J. Cisplatin overdose: Toxicities and management. Drug Saf. 2009, 32, 1109–1122.

Tucci JR. Zoledronic acid therapy of patients with Paget's disease of bone resistant to or with unsustained remission following prior bisphosphonate therapy. *Endocr Pract.* 2015 Oct;21(10):1111-6.

Ueda Y, Shimizu N. Effects of pulse frequency of low-level laser therapy (LLLT) on bone nodule formation in rat calvarial cells. *J Clin Laser Med Surg* 2003 Oct;21(5):271-7.

Uehara M, Inokuchi T, Ikeda H. Enhanced susceptibility of mouse squamous cell carcinoma to photodynamic therapy combined with low-dose administration of cisplatin. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006 Mar;64(3):390-6.

Victor M. Gonzalez, Miguel A. Fuertes, Carlos Alonso and Jose M. Perez. Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by Apoptosis? *Mol Pharmacol.* 2001 Apr;59(4):657-63.

Visacri MB, Ferrari GB, Dias P, Pimentel R, de Souza CM, Costa AP, de Carvalho Pincinato E, Lima CS, Mazzola PG, Moriel P. Quality of Life of Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck Receiving High-Dose Cisplatin Chemotherapy and Radiotherapy. *South Med J.* 2015

Jun;108(6):343-9.

Vladimirov IuA, Klebanov GI, Borisenko GG, Osipov AN. Molecular and cellular mechanisms of the low intensity laser radiation effect. *Biofizika*. 2004 Mar-Apr;49(2):339-50.

Volpato LE, de Oliveira RC, Espinosa MM, Bagnato VS, Machado MA. Viability of fibroblasts cultured under nutritional stress irradiated with red laser, infrared laser, and red light-emitting diode. *J Biomed Opt*. 2011 Jul;16(7):075004.

Walter C, Pabst A, Ziebart T, Klein M, Al-Nawas B. Bisphosphonates affect migration ability and cell viability of HUVEC, fibroblasts and osteoblasts in vitro. *Oral Dis*. 2011 Mar;17(2):194-9.

Wang D and Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4(4): 307-20.

Wang G, Reed E, Li QQ. Molecular basis of cellular response to cisplatin chemotherapy in non-small cell lung cancer (Review). *Oncol Rep*. 2004 Nov;12(5):955-65.

Wendlová J, Galbavý S, Paukovic J. Paget's disease of bone-- treatment with alendronate, calcium and calcitriol. Vnitr Lek. 1999 Oct;45(10):602-5.

Westendorf AF, Bodtke A, Bednarski PJ. Dalton Trans. 2011 May 21;40(19):5342-51. Studies on the photoactivation of two cytotoxictrans,trans,trans-diazidodiaminodihydroxo-Pt(IV) complexes.

Wolf, Ao. Peter. Photodynamische Therapie: Grundlagen und klinische Anwendung in der Dermatologie. Dtsch Arztebl 1999; 96(22): A-1493 / B-1273 / C-1195.

Xuan W, Vatansever F, Huang L, Hamblin MR. Transcranial low-level laser therapy enhances learning, memory, and neuroprogenitor cells after traumatic brain injury in mice. J Biomed Opt. 2014;19(10):108003.

Yasuharu Takenoshita. Clinical, Radiological, and Histopathological Study for 12 Cases of the Osteosarcoma in the Jaws. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery (Impact Factor: 1.43). 09/2007; 65(9).

Ying-Ying Huang, Michael Hamblin, and Aaron C.-H. Chen. Low-level laser therapy: an emerging clinical paradigm. SPIE Newsroom. 9 July 2009.

Young DR, Virolainen P, Inoue N, Frassica FJ, Chao EY. The short-term effects of cisplatin chemotherapy on bone turnover. J Bone Miner Res. 1997 Nov;12(11):1874-82.

Yuan ZM, Shioya H, Ishiko T, Sun X, Gu J, Huang YY, Lu H, Kharbanda S, Weichselbaum R, Kufe D. p73 is regulated by tyrosine kinase c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. Nature. 1999 Jun 24;399(6738):814-7.

Zamble DB and Lippard SJ. Cisplatin and DNA repair in cancer chemotherapy. Trends Biochem Sci 1995: 20(10): 435-9.

Zhang CX, Lippard SJ. New metal complexes as potential therapeutics. Curr Opin Chem Biol. 2003 Aug;7(4):481-9.

7. Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: WIRKUNGSWEISE DER LASERSTRAHLUNG AUF DER ZELLULÄREN EBENE (MODIFIZIERT NACH HUANG 2009).....	12
ABBILDUNG 2: DARSTELLUNG DER PHOTODYNAMISCHEN THERAPIE (MODIFIZIERT NACH MANSFIELD 2001).....	16
ABBILDUNG 3: STRUKTURFORMELN VON CISPLATIN UND TRANSPLATIN (MODIFIZIERT NACH GALEA 2008).....	32
ABBILDUNG 4: DARSTELLUNG DER UV-A LICHTSTRAHLUNG INDUZIERTEN TOXIZITÄT VON TRANSPLATIN (MODIFIZIERT NACH HERINGOVA 2006).....	32
ABBILDUNG 5: DIE UMWANDLUNG VON TETRAZOLIUM IN FORMAZAN (MODIFIZIERT NACH TAZOE 2000).....	45
ABBILDUNG 6A: XTT-MESSUNG UNTER INKUBATION MIT ZOLENDRONsäURE.....	51
ABBILDUNG 6B: XTT-MESSUNG UNTER INKUBATION MIT ZOLENDRONsäURE.....	52
ABBILDUNG 7A: XTT-MESSUNG UNTER INKUBATION MIT CISPLATIN.....	53
ABBILDUNG 7B: XTT-MESSUNG UNTER INKUBATION MIT	

CISPLATIN.....	54
ABBILDUNG 8: HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG VON HUMANEN OSTEOBLASTEN.....	57
ABBILDUNG 9: HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG VON HUMANEN OSTEOBLASTEN.....	58
ABBILDUNG 10: HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG VON SAOS-2 ZELLEN.....	59
ABBILDUNG 11: HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNG VON SAOS-2 ZELLEN.....	60

8. Lebenslauf

9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten (in alphabetischer Reihenfolge ohne akademischen Grad):

Draenert, Mandic, Neff.

Meine akademischen Lehrer in Daraa und Damaskus (Syrien) waren die Damen und Herren Professoren, Dozenten und Chefärzte (in alphabetischer Reihenfolge ohne akademischen Grad):

Abd Alhak, Abu Khaled, Abu Mahmoud, Abu Nassar, Darwish, Ibrahim, Jalouk, Khatab, Mashlah, Murad, Nasrallah, Qutma, Sharani, Tulaimat, Zenati.

10. Danksagung

Hiermit möchte ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Dr. A. Neff bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen.

Herrn Dr. Dr. Apl. Prof. Draenert danke ich recht herzlich für die Themastellung und die ausgezeichnete Betreuung.

Auch für die mühevolle Arbeit des Korrekturlesens und stete Diskussionsbereitschaft möchte ich mich sehr bei Herrn Dr. Dr. Heymann bedanken.

Besonderen Dank an Herrn Prof. Dr. Mandic und die ganze Arbeitsgruppe (Frau Roswitha Peldszus und Frau Maria Sadowski) für die gemütliche Arbeitsatmosphäre und ständige Hilfsbereitschaft im Labor.

Bei meiner ganzen Familie möchte ich mich ganz besonders herzlich für die liebevolle Unterstützung während meines Studiums bedanken.

11. Ehrenwörtliche Erklärung